

Philipps



Universität  
Marburg

# **Strukturelle und biophysikalische Analyse von Adhäsionsdomänen des Flo11-Typs aus Ascomyceten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Timo Heinrich Kraushaar, M.Sc. Biologie

aus Schwalmstadt

Marburg an der Lahn, 2016



Die vorliegende Dissertation wurde unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen von Dezember 2012 bis Dezember 2015 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg angefertigt

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg  
(Hochschulkennziffer 1180)

Als Dissertation angenommen am: \_\_\_\_\_

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Fachbereich Chemie, Marburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch (Fachbereich Biologie, Marburg)





## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Strukturelle und biophysikalische Analyse von Adhäsionsdomänen des Flo11-Typs aus Ascomyceten“**

selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate wurden als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde weder in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form bei einer anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

---

Ort, Datum

---

(Timo Kraushaar)

## Publikationen

**Kraushaar, T.**, Brückner, S., Veelders, M., Mikolaiki, M., Patil, V., Mösch, H. U., Essen, L.-O. (In Vorbereitung) *Structural Base for Homo- and Heterophilic Interactions Mediated by KpFlo11, an Adhesin from the Biotechnological Yeast Komagataella pastoris.*

**Kraushaar, T.**, Bruckner, S., Veelders, M., Rhinow, D., Schreiner, F., Birke, R., Pagenstecher, A., Mosch, H. U., and Essen, L.-O. (2015) *Interactions by the Fungal Flo11 Adhesin Depend on a Fibronectin Type III-like Adhesin Domain Girdled by Aromatic Bands.* Structure 23, 1005-1017

Miethke, M., **Kraushaar, T.**, and Marahiel, M. A. (2013) *Uptake of xenosiderophores in Bacillus subtilis occurs with high affinity and enhances the folding stabilities of substrate binding proteins.* FEBS Lett. 587, 206-213

## Konferenzbeiträge

XI International Fungal Biology Conference, 2013 (Seminarbeitrag)

**Kraushaar, T.**, Veelders, M., Brückner, S., Mösch, H. U., Essen, L.-O. – *Molecular basis of FLO11 mediated interactions in Saccharomyces cerevisiae*

Molecular Life Sciences, 2013

Essen L-O, Kalugin V, Kock M, **Kraushaar T**, Veelders M, Maestre-Reyna M, *Green beards, beer & candidiasis: Fungal adhesion and its molecular base.*

## In der wwPDB hinterlegte Proteinstrukturen

Veelders, M., **Kraushaar, T.**, Brückner, S., Rhinow, D., Mösch, H. U., Essen, L.-O.

**4UYR** X-ray structure of the N-terminal domain of the flocculin Flo11 from *Saccharomyces cerevisiae*

**Kraushaar, T.**, Veelders, M., Brückner, S., Rhinow, D., Mösch, H. U., Essen, L.-O.

- 4UYS** X-ray structure of the N-terminal domain of the flocculin Flo11 from *Saccharomyces cerevisiae*
- 4UYT** X-ray structure of the N-terminal domain of the flocculin Flo11 from *Saccharomyces cerevisiae*
- Kraushaar, T.**, Brückner, S., Mikolaiski, M., Schreiner, F., Veelders, M., Mösch, H. U., Essen, L.-O.
- 5FV5** *KpFlo11* presents a novel member of the Flo11 family with a unique recognition pattern for homophilic interactions
- 5FV6** *KpFlo11* presents a novel member of the Flo11 family with a unique recognition pattern for homophilic interactions



Gewidmet meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>21</b>
1.1	Hefen .....	21
1.1.1	Die Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
1.1.2	Die methylotrophe Hefe <i>Komagataella pastoris</i> .....	23
1.2	Die pilzliche Zellwand .....	25
1.2.1	Hydrophobine in pilzlichen Zellwänden .....	27
1.3	Adhäsiene und Flokkuline in Hefen .....	27
1.4	A-Domänen abhängige Adhäsionsmechanismen in Hefen .....	30
1.4.1	Charakterisierung adhäsiver Kräfte in Mikroorganismen .....	32
1.5	Das Flokkulin Flo11 .....	33
1.5.1	Flo11-abhängige Phänotypen in <i>S. cerevisiae</i> .....	35
1.6	Zielsetzung .....	38
<b>2</b>	<b>Material .....</b>	<b>39</b>
2.1	Geräte .....	39
2.2	Verbrauchsmaterialien .....	41
2.3	Chemikalien .....	42
2.4	Enzyme .....	43
2.5	Oligonukleotide zur Genamplifikation .....	44
2.6	Oligonukleotide für die qRT-PCR .....	45
2.7	Vektoren .....	45
2.7.1	pCR™2.1-TOPO™ TA Vektor .....	45
2.7.2	pET-28a(+)-Vektor .....	46
2.7.3	Klonierte Konstrukte zur Expression in <i>E. coli</i> .....	46
2.8	Bakterienstämme .....	47
2.8.1	<i>E. coli</i> TOP10F' .....	47
2.8.2	<i>E. coli</i> DH5α .....	48
2.8.3	<i>E. coli</i> SHuffle® T7 Express .....	48

<b>2.9</b>	<b>Hefestämme.....</b>	<b>49</b>
2.9.1	<i>Pichia pastoris</i> DSMZ 70382 .....	49
2.9.2	<i>Pichia pastoris</i> GS115 .....	49
2.9.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> $\Sigma$ 1278b RH2662.....	49
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Methoden der Molekularbiologie .....</b>	<b>50</b>
3.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	50
3.1.2	Kultivierung von <i>K. pastoris</i> GS115 .....	50
3.1.3	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	51
3.1.4	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	52
3.1.5	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	52
3.1.6	RNA Extraktion von <i>K. pastoris</i> GS115 .....	53
3.1.7	Synthese von cDNA aus RNA .....	55
3.1.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	55
3.1.9	Agarosegelelektrophorese.....	58
3.1.10	Klonierung .....	59
3.1.11	Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR).....	61
<b>3.2</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>63</b>
3.2.1	Genexpression von <i>FLO11A</i> Domänen in <i>E. coli</i> .....	63
3.2.2	Präparativer Zellaufschluss .....	64
3.2.3	Ni-NTA Affinitätschromatographie .....	64
3.2.4	Größenausschlusschromatographie.....	65
3.2.5	Ankonzentration von Proteinlösungen .....	65
<b>3.3</b>	<b>Analytische Methoden .....</b>	<b>66</b>
3.3.1	SDS-PAGE.....	66
3.3.2	Konzentrationmessung von Proteinlösungen .....	67
3.3.3	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) .....	68
3.3.4	Oberflächenplasmonresonanz (Biacore) .....	69



3.3.5	Berechnung des Dimer-Anteils aus der $K_D$ .....	72
3.3.6	Circulardichroismus-(CD) Spektroskopie .....	73
<b>3.4</b>	<b>Methoden der Röntgenstrukturanalyse .....</b>	<b>74</b>
3.4.1	Kristallisation von Proteinen .....	75
3.4.2	Optimierung von Kristallisationsbedingungen .....	77
3.4.3	Vorbereiten der Kristalle für Röntgenbeugungsexperimente.....	78
3.4.4	Röntgenbeugungsexperimente .....	78
3.4.5	Prozessierung der Datensätze .....	79
3.4.6	Lösung des Phasenproblems durch Molekularen Ersatz (MR) .....	79
3.4.7	Strukturverfeinerung.....	81
3.4.8	Kleinwinkelstreuung (SAXS) .....	83
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>85</b>
4.1	Phylogenetische Einordnung der Flo11 Domäne .....	87
4.2	Die Flo11A Domäne aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C.....	88
4.2.1	Produktion und Aufreinigung von ScFlo11A.....	88
4.2.2	Kristallisation von Flo11A-His <sub>6</sub> und Flo11A .....	91
4.2.3	Die Struktur von Flo11A-His <sub>6</sub> und Flo11A .....	95
4.2.4	Eigenschaften der Flo11A Domäne aus <i>S. cerevisiae</i> S288C .....	97
4.2.5	CD-Spektroskopie von Flo11A aus <i>S. cerevisiae</i> S288C.....	102
4.2.6	Kälte-induzierte Aggregation der Flo11A Domäne .....	104
4.2.7	Homophile ScFlo11A-ScFlo11A Interaktionen .....	106
4.2.8	<i>In vivo</i> Studien zur Flo11A-Flo11A Interaktion .....	109
4.2.9	Mutationsstudien an aromatischen Resten von ScFlo11A .....	112
4.2.10	SAXS Analysen der ScFlo11A Domäne.....	116
4.3	Die Flo11A Domäne aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> $\Sigma$ 1278b .....	118
4.4	Expression von Flokkulinen in <i>Komagetaella pastoris</i> .....	121
4.5	Die Flo11A1 Domäne von <i>KpFlo11-1</i> aus <i>K. pastoris</i> .....	122
4.5.1	Produktion und Aufreinigung von <i>KpFlo11A1</i> .....	124

4.5.2	CD Spektroskopie von <i>KpFlo11A1</i> .....	125
4.5.3	Kristallisation von <i>KpFlo11A1</i> .....	128
4.5.4	Die Kristallstruktur von <i>KpFlo11A1</i> .....	131
4.5.5	Die funktionalen Elemente von <i>KpFlo11A1</i> .....	133
4.5.6	Kontaktwinkelmessungen mit <i>KpFlo11A1</i> und <i>ScFlo11A</i> .....	135
4.5.7	Bindungsstudien der <i>KpFlo11A1</i> -Interaktion .....	137
4.5.8	SAXS Analyse von <i>KpFlo11A1</i> .....	140
4.5.9	Untersuchungen zur Dimerbildung der Flo11A Domäne .....	140
<b>4.6</b>	<b>Die Flo11A Domänen <i>KpFlo11-2A</i> und <i>KpFlo11-3A</i>.....</b>	<b>145</b>
4.6.1	Produktion von <i>KpFlo11-2A</i> und <i>KpFlo11-3A</i> .....	145
4.6.2	CD Spektroskopie von <i>KpFlo11-2A</i> und <i>KpFlo11-3A</i> .....	147
4.6.3	Kristallisation von <i>KpFlo11-2A</i> und <i>KpFlo11-3A</i> .....	149
4.6.4	SAXS Analyse von <i>KpFlo11-2A</i> und <i>KpFlo11-3A</i> .....	150
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>152</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Struktur der Flo11A Domäne .....</b>	<b>153</b>
<b>5.2</b>	<b>Die funktionellen Elemente von Flo11A .....</b>	<b>157</b>
5.2.1	Die aromatischen Reste .....	157
5.2.2	Die sauren Reste.....	159
5.2.3	Flo11A: Ein membrangebundenes Hydrophobin? .....	160
<b>5.3</b>	<b>Vergleich zwischen <i>ScFlo11A</i> und <i>KpFlo11A1</i> .....</b>	<b>164</b>
5.3.1	Struktureller Vergleich zwischen <i>ScFlo11A</i> und <i>KpFlo11A1</i> .	165
5.3.2	Glykosylierung von <i>ScFlo11A</i> und <i>KpFlo11A1</i> .....	169
5.3.3	Interaktionsverhalten von <i>ScFlo11A</i> und <i>KpFlo11A1</i> .....	171
5.3.4	Die Flo11A Domäne als <i>Green Beard Gene</i> ? .....	174
<b>5.4</b>	<b>Das Flo11A-Flo11A Interaktionsmodell .....</b>	<b>175</b>
5.4.1	Flo11A-Flo11A Interaktion <i>in vitro</i> .....	177
5.4.2	Interaktion über aromatische Bänder.....	179
5.4.3	Die „gebündelte“ Kraft von Flo11A .....	181

5.5	Ausblick.....	184
6	Literaturverzeichnis .....	187
7	Anhang.....	208
7.1	SAXS Kurven.....	208
7.2	Aminosäuresequenzen der analysierten Flo11A Domänen .....	210
7.3	Abkürzungen.....	211
8	Danksagung.....	212



---

## Zusammenfassung

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* verfügt über eine Reihe zellwand-verankerter Proteine, die für Zell-Zell bzw. Zell-Oberflächenkontakte zuständig sind. Diese Adhäsine oder Flokkuline genannten Proteine zeigen übereinstimmend einen Aufbau aus A-, B- und C-Domäne, wobei die N-terminale A-Domäne für die Substratbindung zuständig ist. Die Adhäsine können grob in zwei Gruppen unterteilt werden, den PA14-Typ und den Flo11-Typ. Der PA14-Typ beinhaltet die Flokkuline Flo1, Flo5, Flo9, Flo10 und hat kennzeichnend die PA14-Domäne als Kernstruktur. Der Flo11-Typ dagegen bildet eine eigene Pfam Familie (PF10182) und zeigt keine Homologie zu der PA14 Proteinfamilie. Die Flo11 vermittelten Phänotypen aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigen eine große Diversität (Biofilme, Flokkulation, Flor-Bildung, Filamente), haben aber als gemeinsames Merkmal die Zell-Zell bzw. Zell-Oberflächen-Adhäsion. In dieser Arbeit konnte die Kristallstruktur der Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae* S288C (ScFlo11A) und *K. pastoris* GS115 (KpFlo11A1) gelöst werden. Trotz einer geringen Sequenzidentität von 30 % zeigen beide Flo11A Domänen eine konservierte 3D-Struktur mit einer Fibronectin Typ III Domäne als Kernstruktur. Anders als die Flokkuline des PA14-Typs bindet die Flo11A Domäne keine Zuckerliganden, sondern vermittelt homotypische Flo11A-Flo11A Interaktionen über oberflächenexponierte aromatische Reste (Tryptophan und Tyrosin). Diese sind eingebettet in Gruppen von sauren Resten (Aspartat und Glutamat), sodass eine homotypische Bindung nur stattfinden kann, wenn die Domänen nahezu elektrisch neutral vorliegen. Die daraus resultierende pH-Abhängigkeit der Interaktion bildet die molekulare Grundlage der Zell-Zell-Adhäsion von Hefen unter sauren Bedingungen. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) wurden für die beiden homotypischen Flo11A-Flo11A Interaktionen (ScFlo11A-ScFlo11A und KpFlo11A1-KpFlo11A1)  $K_D$ -Werte von 20 bzw. 30  $\mu$ M bei pH 5,5 bestimmt. Die heterotypische ScFlo11A-KpFlo11A Interaktion zeigte dagegen eine  $K_D$  von 121  $\mu$ M. Die verminderte Affinität zeigte sich vor allem in der Assoziation ( $k_{on}$ ), während die Dissoziation ( $k_{off}$ ) bei allen Interaktionen ähnlich war. Mit Hilfe struktureller und biophysikalischer Methoden konnte so der ungewöhnliche Adhäsionsmechanismus der Flo11A-Flo11A Interaktion aufgeklärt werden.

---

---

## Summary

The baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* harbors a set of cell wall anchored proteins that confer cell-cell or cell-surface interactions. These proteins called flocculins or adhesins share a common architecture consisting of an A-, B- and C-domain with the A-domain responsible for substrate binding. The adhesins can be divided into two independent groups, the PA14-type and the Flo11-type. The PA14-type contains the flocculins Flo1, Flo5, Flo9, Flo10 and these proteins have a central PA14 domain as core structure. The Flo11-type forms an own Pfam family (PF10182) and shows no homology to the PA14-type. The Flo11-dependent phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae* show a great diversity (biofilms, flocculation, flori formation, filaments), but with adhesion to cells or surfaces as connecting element. In this work the crystal structures of the Flo11A domains from *S. cerevisiae* (ScFlo11A) and *K. pastoris* GS115 (KpFlo11A1) could be solved. Although these two Flo11A domains share a sequence identity of only 30 %, the 3D structure is highly conserved with a Fibronectin type III domain as core structure. In comparison to the flocculins of the PA14-type the Flo11A domain doesn't bind any sugar moieties but confers homotypic Flo11A-Flo11A interactions via surface exposed aromatic residues (tryptophan and tyrosin). These aromatic residues are embedded into groups of acidic residues, namely aspartate and glutamate. Hence a homotypic interaction can only occur when both domains are almost uncharged. The resulting pH-dependence of the interaction forms the molecular basis for cell-cell adhesion of yeasts under acidic conditions. At pH 5.5 a  $K_D$  value of 20  $\mu\text{M}$  for the ScFlo11A-ScFlo11A interaction and 30  $\mu\text{M}$  for the KpFlo11A1-KpFlo11A1 interaction could be delineated by *Surface Plasmon Resonance* (SPR). The heterotypic ScFlo11A-KpFlo11A interaction showed a  $K_D$  of 121  $\mu\text{M}$ . The reason for this reduced affinity was mainly due to a slower association ( $k_{\text{on}}$ ) while the dissociation ( $k_{\text{off}}$ ) was almost unaffected. This work could help elucidating the unusual adhesion mechanism of the Flo11A-Flo11A interaction by combining structural and biophysical methods.

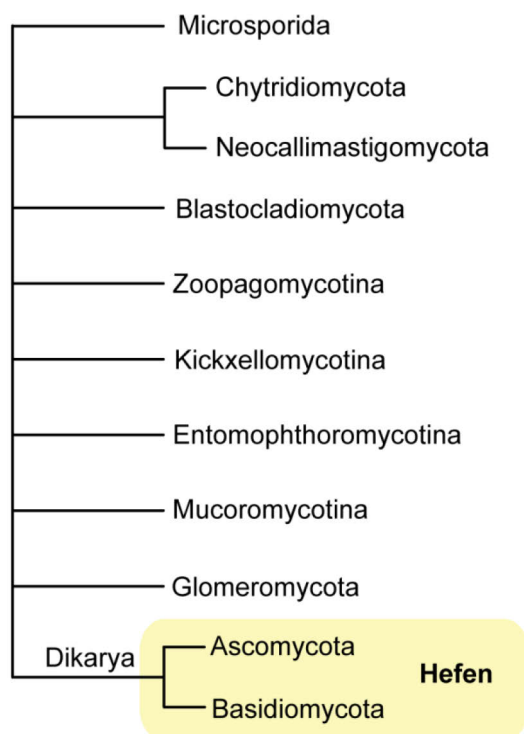
---



# 1 Einleitung

## 1.1 Hefen

Hefen sind einzellige, eukaryotische Mikroorganismen, die dem Reich der Pilze angehören und für gewöhnlich eine Zellgröße von 2 bis 3  $\mu\text{m}$  in der Länge und 1 bis 10  $\mu\text{m}$  in der Breite haben<sup>2</sup>. Einige Vertreter, wie z.B. die humanpathogene Hefe *Blastomyces dermatitidis*, erreichen einen Durchmesser von bis zu 40  $\mu\text{m}$  im Durchmesser<sup>3</sup>. Sie können in zwei Abteilungen, Schlauchpilze (Ascomycota) und Ständerpilze (Basidiomycota), untergliedert werden, welche



**Abbildung 1 Phylogenie und Systematik von Pilzen.** Die Astlängen sind nicht proportional zu den genetischen Abständen<sup>1</sup>.

und Ständerpilze (Basidiomycota), untergliedert werden, welche wiederum das Unterreich der Dikarya bilden (Abbildung 1). Dieses Taxon wurde 2007 beschreiben, um die gemeinsamen Merkmale von Schlauch- und Ständerpilzen zu beschreiben<sup>1</sup>. Das Hauptmerkmal der Dikarya besteht darin, dass sie in ihrem Lebenszyklus Stadien mit zwei Zellkernen pro Zelle besitzen. Diese können filamentös oder einzellig sein, aber ohne Flagellen. Obwohl Hefen einzellige Organismen sind, ähnelt ihre zelluläre Organisation höheren Organismen. So ist z.B. ihr genetisches Material

in einem Zellkern untergebracht. Hefen sind in der Natur weit verbreitet und besiedeln unterschiedliche Habitate. So kommen sie auf Blättern, Pflanzen, Früchten und im Boden vor. Des Weiteren besiedeln sie menschliche Haut und den Magen-Darm-Trakt von warmblütigen Tieren, wo sie entweder symbiotisch oder als Parasiten vorkommen können. Eine typische Hefeinfektion wird von *Candida albicans* verursacht.

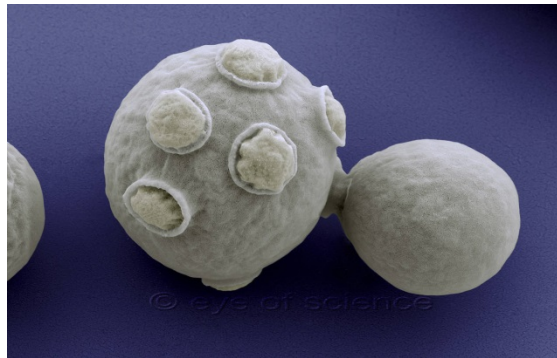
Hefen vermehren sich i.d.R. durch Sprossung oder Teilung. Hier wird eine kleine Sprosse zur Tochterzelle der Mutterzelle und vergrößert sich mit dem Wachstum. Wenn die Tochterzelle wächst, verdoppelt und segregiert die Mutterzelle ihre DNA. Anschließend teilt sich der Zellkern und migriert in die Tochterzelle. Sobald diese dann einen Zellkern enthält und eine gewisse Größe erreicht hat, separiert sie sich von der Mutterzelle. Diese Ereignisse, die Duplikation und Teilung beinhalten, werden als Zellzyklus bezeichnet. Hefen können sich aber auch sexuell vermehren, sie existieren in zwei verschiedenen Paarungstypen,  $a$  Zellen und  $\alpha$  (alpha) Zellen. Treffen sich Zellen von entgegengesetztem Paarungstyp, können sie sich durch Konjugation paaren. Dabei fusionieren zuerst die Zellen und anschließend die Zellkerne, wodurch sich eine diploide Zelle mit zwei Kopien von jedem Chromosom bildet. Diploide Zellen können sich dann asexuell durch Sprossung vermehren, ähnlich den haploiden Stadien. Werden diploide Zellen Nährstoffmangel ausgesetzt, können sie durch Meiose Sporen bilden, wodurch der Chromosomensatz wieder auf eins reduziert wird. Diese Sporen sind resistent gegen Umwelteinwirkungen und können sehr lange Zeit überdauern, bis die Nährstoffbedingungen wieder besser werden und die Zellen sich wieder asexuell vermehren können.

Werden Hefen in nährstoffreichem Medium, z.B. Glukose, herangezogen, wachsen sie dennoch bevorzugt durch Fermentation. Dort wird Glukose zu Kohlenstoffdioxid und Ethanol umgesetzt. Fermentation ist ein anaerober Prozess, da er in Abwesenheit von Sauerstoff stattfindet. Selbst in Anwesenheit von Sauerstoff bevorzugen Hefezellen aber Energiegewinnung durch Fermentation. Dieses Phänomen wird *Crabtree*-Effekt genannt, benannt nach dem Biologen, der dies zuerst beobachten konnte<sup>4</sup>. Der Prozess der Alkoholgärung ist von großem kommerziellem Interesse bei der Brotherstellung, Bierbrauen, Weinherstellung und anderen alkoholhaltigen Getränken. Während Nährstofflimitation können Hefen aber auch aerob durch Zellatmung wachsen. Dabei wird Glukose zu Kohlenstoffdioxid oxidiert und Sauerstoff zu Wasser reduziert.

### 1.1.1 Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* ist ein einzelliger, eukaryotischer Pilz und gehört aufgrund der Form seiner vegetativen Vermehrung zu den Knospungshefen (engl. *budding yeast*)<sup>5</sup>. Dabei bildet die Mutterzelle einen Auswuchs, der sich

nach Einwandern des Tochterkerns als Tochterzelle abschnürt. Hierbei handelt es sich um diploide Zellen (Abbildung 2). Eine sexuelle Reproduktion durch Meiose ist ebenfalls möglich, wobei sich in der nun Ascus genannten Mutterzelle 4 haploide Tochterzellen bilden (Ascosporen). Es werden zwei verschiedene „Paarungstypen“ (engl. *mating types*) mit der Bezeichnung a und  $\alpha$  (alpha) unterschieden.



**Abbildung 2** *Saccharomyces cerevisiae*. Dargestellt ist eine Mutterzelle (groß) und eine sich abtrennende Tochterzelle (klein). Scanning electron microscope, 12,500:1 (at 15x12cm). Eye of Science.

Das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* war das erste eukaryotische Genom, das vollständig sequenziert wurde<sup>6</sup>. Es besteht aus 13 Millionen Basenpaaren (bp) und 6275 Genen in 16 Chromosomen. Dabei zeigen mehr als 23 % Homologie zu Genen im humanen Genom.

Der Stoffwechsel der Bäckerhefe ist fakultativ anaerob, d.h. die Energiegewinnung kann sowohl aerob unter Reduktion von Sauerstoff erfolgen, als auch durch Gärung unter Abwesenheit von Sauerstoff (anaerob). Bei der aeroben Atmung werden Kohlenhydrate zu  $\text{CO}_2$  oxidiert und Sauerstoff zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduziert. Bei der Gärung wird Glukose zu Ethanol und  $\text{CO}_2$  umgesetzt. Dieser Prozess wird seit tausenden von Jahren für die Produktion von Bier, Wein, Brot und anderen industriellen Produkten genutzt. Ebenso wird die Hefe heutzutage bei der Herstellung von Bioethanol, der als Biokraftstoff verwendet wird, eingesetzt<sup>7</sup>.

### 1.1.2 Die methylotrophe Hefe *Komagataella pastoris*

*Komagataella pastoris* ist eine methylotrophe Hefe, d.h. sie kann mit Methanol als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen. Dafür besitzt es zwei Gene, die für Alkoholoxidasen codieren, *AOX1* und *AOX2*<sup>8</sup>. Die *AOX*-Promotoren

werden durch Methanol induziert und können z.B. durch Glukose reprimiert werden. Die meisten der methylotrophen Hefen können in einem phylogenetischen Baum, basierend auf der ribosomalen DNA der D1/D2 Domäne der großen Untereinheit (26S), gruppiert werden. Ausgenommen davon ist *Pichia pastoris*, welches separat von allen methylotrophen Hefen gruppiert. Aufgrund von Analysen der 18S und 26S rRNA durch Yamada *et al.* wurde *P. pastoris* einer neuen Subgruppe zugeordnet, welche den Namen *Komagataella* trägt<sup>9</sup>. Diese Einteilung ist allerdings nicht generell akzeptiert und laut Kurtzman würden dafür weitere Daten benötigt<sup>10</sup>. Das natürliche Vorkommen von *K. pastoris* in Baumexudaten und verrottetem Holz auf mehreren Kontinenten wurde hinreichend beschrieben<sup>11, 12</sup>.

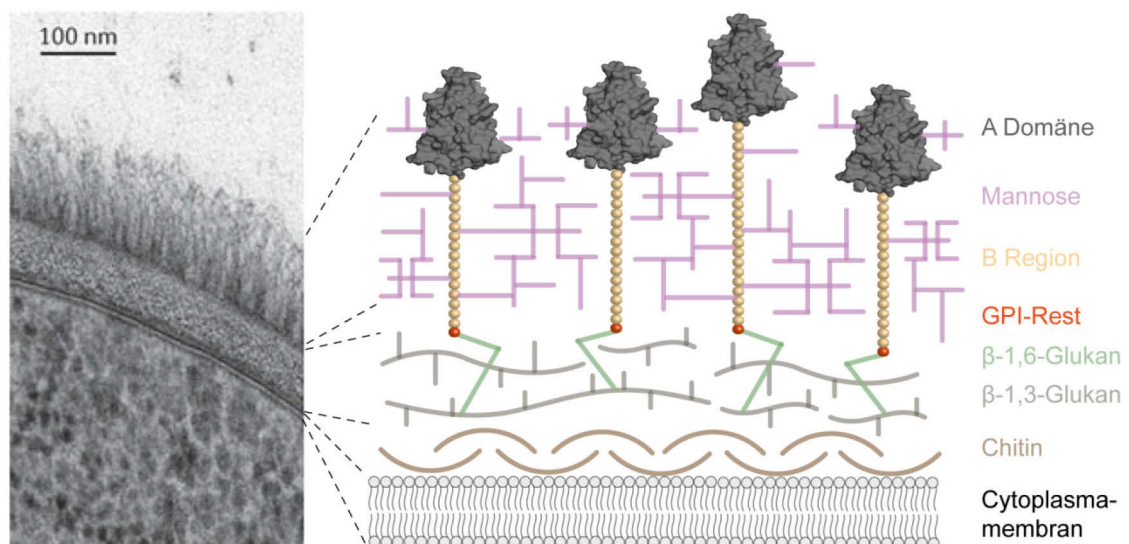
In dieser Arbeit wurde der Stamm *Komagataella (Pichia) pastoris* GS115 verwendet, dessen Genom 2009 vollständig sequenziert wurde<sup>13</sup>. *Komagataella (Pichia) pastoris* wird, ebenso wie *Saccharomyces cerevisiae*, zur Expression von Genen eingesetzt und gilt ebenfalls als Modellorganismus. Neben großen Mengen an korrekt gefalteten Proteinen, können rekombinante Proteine in ihrer nativen, glykosylierten Form erhalten werden. Dabei ist die durchschnittliche Glykankettenlänge, die an das Protein geknüpft wird, in *Komagataella (Pichia) pastoris* etwas kürzer als in *Saccharomyces cerevisiae*<sup>14</sup>. Hefen können eine Glykosylierung am Amid-Stickstoffatom in Asparaginresten in Proteinsequenzen mit dem Sequenzmotiv Asn-Xaa-Thr/Ser vornehmen, welche zu einer N-Glykosylierung führt. Werden die Hydroxygruppen von Threonin und/oder Serin glykosyliert, wird eine O-Glykosylierung erhalten. Studien an N-glykosylierten Proteinen haben eine allgemeine Hefe-Kern-Struktur von Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> identifiziert, welcher am 1,3-Arm um eine Kette von  $\alpha$ -1,6-Mannose Einheiten erweitert wird<sup>14</sup>. Diese können auch durch  $\alpha$ -1,2-Mannose Einheiten verzweigt werden.

Trotz seiner vielfältigen biotechnologischen Nutzung zur heterologen Proteinproduktion, ist über den natürlichen Lebensstil und die adhäsiven Eigenschaften von *Komagataella pastoris* wenig bekannt.

## 1.2 Die pilzliche Zellwand

Die pilzliche Zellwand ist ein dynamisches Organell, das an einer Vielzahl wichtiger Prozesse beteiligt ist. Sie muss einerseits genügend mechanische Stabilität bieten, um dem osmotischen Druck standzuhalten, aber auch ausreichend Plastizität für Wachstum, Zellteilung und Bildung verschiedener Phänotypen während des pilzlichen Lebenszyklus bieten. Zudem ermöglicht sie dem Pilz die Interaktion mit der Umgebung, welche neben der Aufrechterhaltung der Zellform und Integrität gegenüber Umweltstress, die zweite wichtige Funktion darstellt. Die Zellwand vermittelt die Zell-Zell-, als auch die Zell-Substrat-Adhäsion und dient als wichtiger Faktor um Signaltransduktion innerhalb der Zelle zu aktivieren. Störungen in der Zellwand haben einen dramatischen Effekt auf das Wachstum und die Morphologie der Zelle, welche oftmals in der Zellyse und damit dem Tod der Zelle resultiert. Damit erweist sich die pilzliche Zellwand zudem als geeignetes Ziel für anti-fungale Agenzien.

Der strukturelle Aufbau der pilzlichen Zellwand besteht hauptsächlich aus drei Komponenten: Glykoproteine und die beiden Polysaccharide Chitin und Glukan. Diese sind umfangreich miteinander quervernetzt um ein komplexes Netzwerk zu formen, welches die Basis für die Zellwand ist (Abbildung 3).



**Abbildung 3** Struktur und Aufbau der pilzlichen Zellwand. Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme der pilzlichen Zellwand von *C. albicans*<sup>15</sup>. Die Hauptkomponenten sind schematisch dargestellt (mitte): Cytoplasmamembran, Chitin,  $\beta$ -Glukan und glykosylierte Proteine. Die in grau dargestellte A-Domäne stammt von Epa1A aus *Candida glabrata* (PDB code 4AF9).

Chitin ist ein langes, lineares Homopolymer, bestehend aus  $\beta$ -1,4-N-Acetylglucosamin-Einheiten. Obwohl es in der Hefezellwand nur etwa einen Trockengewichtsanteil von 1-2 % ausmacht, ist es doch eine wichtige strukturelle Komponente<sup>16, 17</sup>. In filamentösen Pilzen wie *Neurospora* und *Aspergillus* wurden hingegen auch 10-20 % Chitin berichtet<sup>18, 19</sup>. Sowohl in Hefen als auch filamentösen Pilzen bildet Chitin Mikrofibrillen durch Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Ketten. Diese Polymere sind sehr elastisch und tragen sehr zur Zellwandintegrität bei. Wird die Chitinsynthese gestört, wird die Zellwand ungeordnet und osmotisch instabil<sup>20, 21</sup>.

Glukan bildet mit 50-60 % Trockengewichtsanteil den größten Anteil an der Zellwand<sup>22</sup>. Glukanpolymere bestehen aus sich wiederholenden Glukose-Einheiten, welche durch verschiedene chemische Bindungen zu Ketten verknüpft werden. Der Hauptanteil des Glukans (65-90 %) besteht aus  $\beta$ -1,3-Glukan, aber auch andere Glukane, wie  $\beta$ -1,6-, gemischte  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,4,  $\alpha$ -1,3, und  $\alpha$ -1,4-Glukane wurden in verschiedenen pilzlichen Zellwänden identifiziert<sup>23-25</sup>. Für Hefen konnte gezeigt werden, dass deren Zellwand aus verzweigten  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glukanen besteht<sup>26</sup>.  $\beta$ -1,3-Glukan dient als strukturelle Hauptkomponente, woran die anderen Zellwandkomponenten Chitin und Glykoproteine kovalent gebunden sind<sup>27</sup>. Daher bildet die  $\beta$ -1,3-Glukan-Synthese eine wichtige Bedingung für die korrekte Ausbildung einer intakten Zellwand und der normalen pilzlichen Entwicklung.

Die Glykoproteine bilden den dritten Teil der pilzlichen Zellwand und sind in die Chitin- und Glukan-basierte Matrix eingebettet. Sie machen ca. 30-50 % des Trockengewichtanteils der Zellwand aus bei Hefen wie *S. cerevisiae* oder *C. albicans*, während ihr Anteil bei filamentösen Pilzen ca. 20-30 % beträgt<sup>28, 29</sup>. Viele dieser Proteine besitzen einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker, wodurch sie in der Plasmamembran verankert werden können. Sie sind zudem hochglykosyliert durch N- und O-Glykosylierungen. Die Zellwand von *S. cerevisiae* und *C. albicans* enthält Mannoproteine, welche mit Mannoseresten glykosyliert sind<sup>28</sup>. Der Prozess der N- und O-Glykosylierungen ist bei Eukaryoten konserviert. Die meisten Glykoproteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz, durch welche sie den sekretorischen Pathway passieren. Nachdem sie ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) geschleust wurden, be-

ginnt der Prozess der N- und O-Glykosylierungen, welche dann im ER und Golgi-Apparat modifiziert werden. Zellwandproteine fungieren in der Erhaltung der Zellform, vermitteln Adhäsion für Zell-Zell- und Zell-Substrat Interaktionen, bieten Schutz vor schädlichen Substanzen, vermitteln die Absorption von Substraten und Nährstoffen, leiten intrazelluläre Signale weiter und synthetisieren und verändern die Zellwandkomponenten.

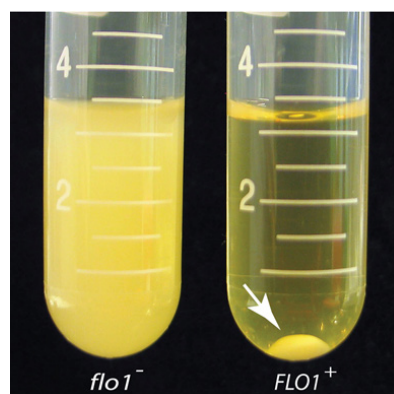
### 1.2.1 Hydrophobine in pilzlichen Zellwänden

Hydrophobine sind eine große, vielfältige Gruppe von Proteinen, die aber bisher ausschließlich in filamentösen Pilzen identifiziert wurden<sup>30</sup>. Dabei können sie bis zu 10% des Trockengewichtsanteils der Zellwand ausmachen. Sie verfügen über eine hydrophobe und eine hydrophile Region, wodurch sie als Tensid fungieren und dem Pilz ermöglichen die Wasser/Luft-Grenzfläche zu durchbrechen. So können oberirdische Strukturen wie Hyphen ausgebildet werden<sup>31</sup>. Diese exponierten hydrophoben Regionen ermöglichen dem Pilz auch die Anlagerung an hydrophoben Oberflächen sowie anderen Hyphen oder Pflanzenblättern. Sie nehmen damit eine wichtige Rolle in der morphogenetischen Entwicklung und der Interaktion mit anderen Organismen ein<sup>32</sup>.

## 1.3 Adhäsine und Flokkuline in Hefen

Die Zellwand dient neben den oben genannten Eigenschaften auch dazu, dass Mikroben mit der Umwelt interagieren können. Dabei spielt die Adhäsion (lat. *adhaerere* „anhaften“) zu anderen Zellen bzw. Oberflächen eine entscheidende Rolle. Adhäsion verhindert, dass Zellen von einer vorteilhaften Umgebung wegwaschen werden und ermöglicht die Etablierung von Biofilmen, welche Schutz vor ungünstigen Bedingungen bieten<sup>33</sup>. Pathogene Hefen nutzen Adhäsion an abiotischen Oberflächen wie z.B. Kunststoffprothesen um Zugang zum Blutkreislauf und inneren Organen von Patienten zu bekommen<sup>34</sup>. Zell-Zell-Adhäsion ist aber auch von industriellem Interesse z.B. im Bierbrauereiwesen und in der Weinherstellung, als effizienter Weg um Biomasse von den Fermentationsprodukten zu trennen. Am Ende des Fermentationsprozesses, wenn alle Kohlenhydrate zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid konvertiert wurden, adhären die Hefezellen aneinander und formen mikroskopische Flocken, die aus tau-

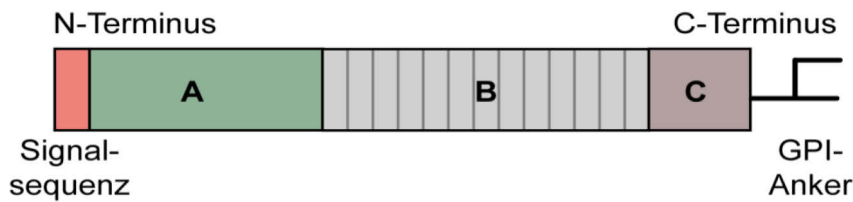
senden von Zellen bestehen können<sup>35</sup> und rasch aus dem Medium sedimentieren (Abbildung 4). Dieses Verhalten führte zur gegenwärtigen Definition von Flokkulation: „Flokkulation ist die asexuelle, reversible und Calcium-abhängige Aggregation von Hefezellen zur Bildung von Flocken, welche aus tausenden von Zellen bestehen und rasch aus dem Medium zum Boden sedimentieren“<sup>36-38</sup>. Abhängig von dem verwendeten Hefestamm sedimentieren die Hefeflocken zum Grund („Lager“ Stämme) oder schwimmen an der Oberfläche („Ale“ Stämme), wodurch ihre Entfernung aus dem Medium erleichtert wird. Zell-Zell-Adhäsion zwischen Hefezellen wird daher auch als Flokkulation bezeichnet.



**Abbildung 4** Sedimentbildung eines Hefestammes, der das Flokkulin Flo1 überproduziert (rechts), während der gleiche Stamm ohne Flo1 keine Flokkulation bildet<sup>39</sup>.

Eine der herausragendsten Eigenschaften der Hefeadhäsion ist die phänotypische Variabilität und Plastizität. Hefezellen können ihre adhäsiven Eigenschaften sehr schnell an neue Umweltbedingungen anpassen und zudem kann das adhäsive Verhalten zwischen eng verwandten Stämmen sehr unterschiedlich sein<sup>33</sup>. Trotz vielfältiger Funktion zeigen alle pilzlichen Adhäsine die gleiche, aus drei Domänen bestehende Organisationsstruktur (Abbildung 5).





**Abbildung 5 Domänenarchitektur pilzlicher Adhäsine<sup>29, 33</sup>.** Das N-terminale Signalpeptid erlaubt den Eintritt in den sekretorischen *Pathway* und die Lokalisation in der Zellwand bzw. Cytoplasmamembran<sup>40</sup>. Die A-Domäne zeigt von der Zelloberfläche weg und enthält eine Kohlenhydrat- oder Peptid-Bindedomäne. Die repetitive, Serin- und Threoninreiche B-Domäne sorgt für die Präsentation der A-Domäne und ist hochglykosyliert. Die C-Domäne enthält einen GPI-Anker, wodurch das Adhäs in der Cytoplasmamembran verankert werden kann.

Die C-terminale Domäne enthält die Erkennungssequenz für einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, wodurch das Adhäs in der Zellwand<sup>41</sup> verankert wird. GPI-Anker sind strukturell komplexe Glykophospholipide, welche posttranslational an das C-terminale Ende von sekretorischen Proteinen angehängt werden, nachdem sie ins ER transloziert wurden<sup>42</sup>. Dabei ist das C-terminale Signal ausreichend für die Addition eines GPI-Ankers<sup>43</sup>. Dieses wird durch eine GPI-Transamidase erkannt, entfernt und durch den GPI-Anker ersetzt. Das C-terminale Signal besteht aus einer hydrophoben Domäne, welche durch einen hydrophilen Abstandhalter von der  $\omega$ -Spaltung/Befestigungsseite getrennt wird. Während in anderen Organismen verschiedene Aminosäuren (Ser, Asp, Ala, Asn, Gly, Cys) als Anker-Befestigungsseite identifiziert wurden, wurden in Hefen bisher nur Asn und Gly gefunden<sup>44-46</sup>. Alle bekannten GPI Proteine von Hefen werden entweder in der Zellwand oder der Cytoplasmamembran verankert<sup>42</sup>. Im ersten Fall wird das Adhäs in kovalent durch den GPI-Rest an  $\beta$ -1,6-Glukane in der Zellwand verankert<sup>47</sup>. Mechanistisch geschieht das in einer Transglykosylierungsreaktion zwischen einem Mannose-Rest des GPI-Ankers (Man1) und einem Glukose-Rest der  $\beta$ -1,6-Glukan-Struktur<sup>42</sup>.

Die B-Domäne zeichnet sich durch viele Serin- und Threonin-reiche Wiederholungen (*Repeats*) aus, welche intensiver O-Glykosylierung unterliegen. Diese können  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen koordinieren und so evtl. eine stabähnliche Struktur einnehmen<sup>37</sup>. Zudem enthalten sie Sequenzen  $\beta$ -verzweigter, aliphatischer Aminosäuren (Leu, Ile, Val), welche ein hohes Potential für  $\beta$ -Aggregation und Amyloid-Bildung zeigen. Dadurch können möglicherweise mehrere A-Domänen ge-

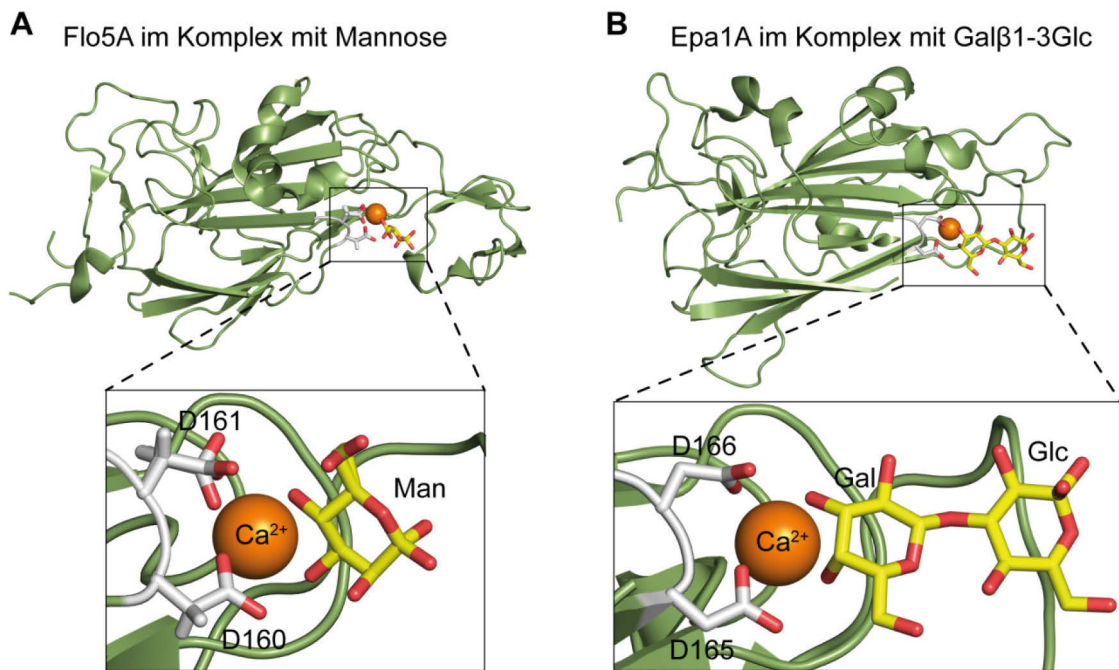
bündelt, auf der Zelloberfläche präsentiert und so die Zell-Zell-Adhäsion verstärkt werden<sup>48, 49</sup>.

Am N-Terminus befindet sich eine Signalsequenz, wodurch das produzierte Adhäsins durch den sekretorischen *Pathway* zur Cytoplasmamembran gelangt<sup>40</sup>. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) beginnt der Prozess der N- und O-Glykosylierung. Alle N-Glykoproteine haben eine gemeinsame verzweigte pentasaccharidische Kernregion der Struktur  $\text{Man}(\alpha 1,6)[\text{Man}(\alpha 1,3)]\text{Man}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}$ , die als Core bezeichnet wird<sup>50, 51</sup>. Diese Kernstruktur wird dann im ER und Golgi-Apparat durch Anhängen und Verkürzen weiterer Zuckerketten intensiv modifiziert.

Die A-Domäne ist die am besten untersuchte Domäne, da sie die Interaktion zu anderen Zellen bzw. Oberflächen vermitteln kann<sup>39, 49, 52</sup>.

### 1.4 A-Domänen abhängige Adhäsionsmechanismen in Hefen

Adhäsion kann in zwei Hauptgruppen untergliedert werden: Lektin-abhängige Adhäsion (Zucker-sensitiv) und Zucker-unabhängige Adhäsion<sup>33, 53</sup>. Die Lektin-abhängige Adhäsion beruht auf der Bindung von Adhäsinen an Zuckerreste auf der Oberfläche von anderen Zellen. Bei Adhäsinen dieser Gruppe beinhaltet die A-Domäne eine C-Typ-lektinartige Zuckerbindedomäne. Hierzu zählen z.B. die Flokkuline Flo1, Flo5 und Flo9 aus *Saccharomyces cerevisiae* und die EPA-Genprodukte der humanpathogenen Hefe *Candida glabrata*. Während die Flokkuline aus *S. cerevisiae* terminale Mannosereste auf anderen Zellen erkennen, binden die Epa Adhäsine von *C. glabrata* an Galaktoside auf Säugerzellen. Ein gut untersuchtes Beispiel ist Epa1, welches bevorzugt an Gal $\beta$ 1-3 Glykane bindet.



**Abbildung 6** Lektin-abhängige Adhäsion mit PA14-artigen Adhäsinen. (A) Flo5A im Komplex mit Mannose (gelb) (PDB ID 2XJP). Das DcisD Motiv ist in Vergrößerung gezeigt. (B) Epa1A im Komplex mit Gal $\beta$ 1-3Glc (gelb) (PDB ID 4AF9). Das DcisD Motiv ist in Vergrößerung gezeigt. Das Ca $^{2+}$ -Ion (orange) ist als CPK-Modell dargestellt.

Trotz großer Unterschiede in der Ligandenspezifikation gehören die A-Domänen der oben genannten Adhäsine topologisch zu den PA14-artigen Domänen und besitzen ein einzigartiges Ca $^{2+}$ -Bindemotiv, das DcisD Motiv. Zwei Aspartatreste sind dort über eine *cis*-Peptidbindung miteinander verbunden um ein Ca $^{2+}$ -Ion zu koordinieren, welches dann den entsprechenden Zucker bindet (Abbildung 6).

Die unterschiedliche Liganden-spezifität und -affinität rührt von einer sehr unterschiedlichen Bindungstasche her. Bei Flo5 wird die Substratspezifität durch eine Flokkulin-spezifische Subdomäne vermittelt, während dies bei Epa1A durch zwei Calcium-bindende Loops, CBL1 und CBL2 und drei weitere äußere Loops geschieht. CBL1 und CBL2 befinden sich im Inneren der Ligandenbindungstasche.

In *S. cerevisiae* kann die Lektin-abhängige Adhäsion weiter in zwei Unterkategorien unterteilt werden: Den Flo1- und NewFlo-Typ. Die Flo1-Gruppe (Flo1, Flo5 und Flo9) bindet nur Mannose-Saccharide, wohingegen der New-Flo-Typ (Lg-Flo1) verschiedene Zucker binden kann, darunter Mannose, Glukose und

Glukose-Oligomere wie z.B. Maltose<sup>54</sup>. Die meisten Braustämme gehören zum NewFlo-Typ, da die kompetitive Inhibition durch verschiedene Zucker vorzeitige Flokkulation verhindert und erst einsetzt, wenn alle Zucker zu Ethanol umgesetzt wurden.

Die zucker-unabhängige Adhäsion beinhaltet Adhäsine, welche Peptide binden oder die Hydrophobizität der Zelloberfläche erhöhen, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen zu abiotischen Oberflächen gefördert werden können<sup>55</sup>. Beispiele hierfür sind z.B. die Als-Proteine von *Candida albicans*, welche bestimmte Peptide ihrer Wirtszellen erkennen<sup>56</sup> oder das Flokkulin Flo11 aus *S. cerevisiae*<sup>57</sup>.

### 1.4.1 Charakterisierung adhäsiver Kräfte in Mikroorganismen

Mikrobielle Adhäsion beinhaltet ein komplexes Repertoire an physikochemischen Kräften, welche in spezifischen Rezeptor-Ligand oder unspezifischen hydrophoben und elektrostatischen Interaktionen (Anziehung und Abstoßung) resultieren können<sup>58</sup>. Dabei wird manchmal zwischen Adhäsion als der Zell-Substrat-Interaktion und Kohäsion als der Zell-Zell-Interaktion, unterschieden<sup>59</sup>. Die beteiligten Kräfte, van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Interaktionen, werden als DVLO-Kräfte (benannt nach Derjaguin, Verwey, Landau und Overbeek) bezeichnet<sup>60, 61</sup>. Die DVLO Theorie wurde benutzt, um die Interaktion einer Zelle zur Oberfläche zu beschreiben. Eine erweiterte DVLO Theorie beinhaltet zusätzlich hydrophobe/hydrophile und osmotische Interaktionen<sup>62</sup>. Insbesondere hydrophobe Interaktionen sind Objekt intensiver theoretischer Betrachtungen<sup>63</sup>. Hydrophobe Wechselwirkungen beruhen auf der Verringerung von Kontaktflächen zwischen Wasser und lipophilen Grenzflächen. Sie entstehen durch enge räumliche Nachbarschaft zwischen unpolaren Molekülen oder Molekülseitenketten in wässrigen Systemen<sup>64</sup>. Die Wechselwirkung entsteht durch die Verdrängung von Wassermolekülen aus dem Bereich zwischen zwei lipophilen Grenzflächen, woraus ein Entropiegewinn des Gesamtsystems resultiert.

**Tabelle 1** Vergleich von maximalen Adhäsionskräften verschiedener Hefestämme an einem hydrophoben Substrat (Dodecylphosphat, DDP) und einem hydrophilen Substrat (Hydroxy-Dodecylphosphat, DDP-OH). Die Werte stammen von Potthoff *et al.*<sup>63</sup> und wurden mittels Rasterkraftmikroskop (AFM) ermittelt.

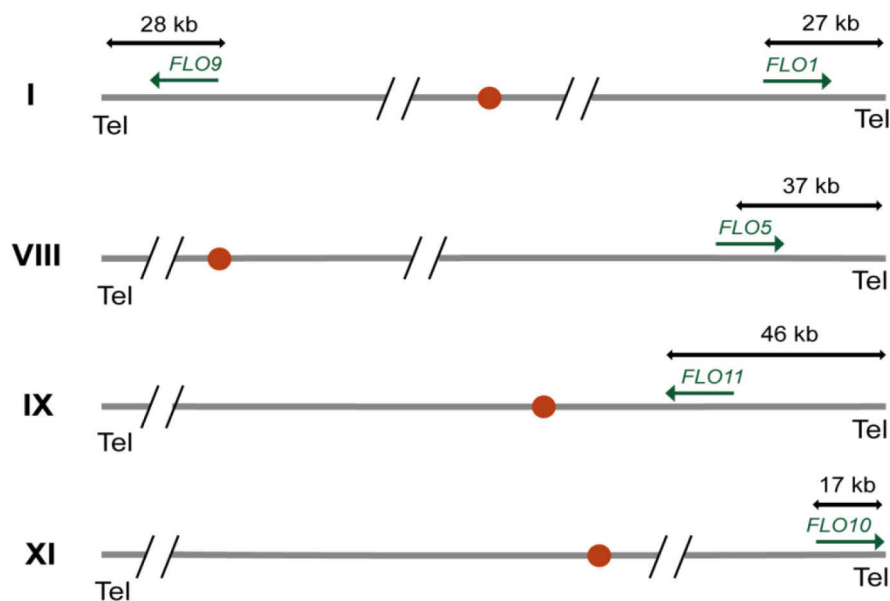
Substrat	Hefestamm	Kraft $\pm$ StEr (nN)
DDP (hydrophob)	<i>C. albicans</i>	39 $\pm$ 7
	<i>S. cerevisiae</i>	5 $\pm$ 1
DDP-OH (hydrophil)	<i>C. albicans</i>	10 $\pm$ 3
	<i>S. cerevisiae</i>	2 $\pm$ 0,3

In Tabelle 1 sind Adhäsionskräfte verschiedener Hefestämme an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen aufgelistet. Die Zellwand von *C. albicans* hat einen stark hydrophoben Charakter und zeigt daher größere Adhäsion an hydrophobere Oberflächen<sup>65</sup>. Dies kommt u.a. zustande durch glykosylierte hydrophobe Oberflächenproteine wie z.B. CAgp38<sup>66</sup>. Generell zeigen hydrophobere Zellen eine stärkere Adhäsion an hydrophoben Oberflächen und hydrophilere Zellen eine stärkere Adhäsion an hydrophilen Oberflächen<sup>67, 68</sup>.

## 1.5 Das Flokkulin Flo11

Das Flokkulin Flo11 aus *Saccharomyces cerevisiae* (var *diastaticus*) wurde 1996 erstmalig beschrieben als putatives membrangebundenes Protein, welches Ähnlichkeiten zu membrangebundenen Mucinen von Säugetieren zeigte<sup>69</sup>. Daher wurde es ursprünglich auch *MUC1* genannt. Dort wurde es als wichtiger Faktor bei invasivem Wachstum und der Ausbildung von Pseudohyphen beschrieben. Aufgrund seiner Rolle bei der Flokkulation, der strukturellen Ähnlichkeit zu anderen Mitgliedern der *FLO* Familie und der Lokalisation des Proteins auf der Zelloberfläche wurde es später jedoch als *FLO11* bezeichnet<sup>69</sup>. Es hat eine Länge von 1367 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 136 kDa, einem isoelektrischen Punkt von 3,98 und zeigt den gleichen dreidomänenartigen Aufbau wie ihn auch die anderen pilzlichen Adhäsine zeigen (Abbildung 5). In *Saccharomyces cerevisiae* S288C befindet sich *FLO11* auf Chromosom IX. Die meisten *FLO*-Gene befinden sich in telomeren Regionen (Abbildung 7) und dies könnte eine wichtige Rolle bei der Expression, genetischen Interaktion und Evolution spielen<sup>70-73</sup>, wohingegen *FLO11* weder zentro-

mer noch telomer lokalisiert ist. In dem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm  $\Sigma 1278b$  ist *FLO11* das einzige Gen dieser Flokkulin-Familie, welches exprimiert wird<sup>57</sup>, die telomer-nahen *FLO* Gene werden nicht exprimiert<sup>71</sup>. Obwohl die stillen *FLO* Gene ein Reservoir für die Variabilität der Zelloberfläche darstellen, ist ihr regulatorischer Mechanismus weitgehend unerforscht<sup>71</sup>. Werden die stillen *FLO* Gene allerdings durch einen heterologen Promotor exprimiert, zeigen sie adhäsive Phänotypen, die sich von den *FLO11*-abhängigen unterscheiden<sup>74, 75</sup>.



**Abbildung 7 Chromosomale Lokalisation von Adhäsine codierenden Genen In *Saccharomyces cerevisiae*.** Die römischen Zahlen auf der linken Seite geben das Chromosom an, auf welchem sich die *FLO* Gene befinden. Die roten Punkte zeigen die Position des Zentromers an. Die *FLO* Gene befinden sich alle innerhalb der 40 kb Telomerregion (Tel). *FLO11* ist weder telomer noch zentromer lokalisiert. Modifiziert nach Verstrepen *et al.*<sup>75</sup>

Die Adhäsine Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10 werden Flokkuline genannt, weil sie Zell-Zell-Adhäsion unterstützen<sup>76</sup>, indem sie terminale Mannosereste auf der Zelloberfläche von benachbarten Zellen erkennen. Die Flo11-abhängigen Phänotypen scheinen dagegen entweder  $Ca^{2+}$ -unabhängig oder zumindest nicht durch Mannose inhibierbar zu sein<sup>57, 77</sup>, womit sich Flo11 von den klassischen Flokkulinen unterscheidet. Somit könnte Flo11 einen dominanten Einfluss auf die Lebensweise von *S. cerevisiae* haben.

### 1.5.1 Flo11-abhängige Phänotypen in *S. cerevisiae*

Flo11 scheint bei der Etablierung vieler multizellulärer Strukturen in *Saccharomyces* Stämmen beteiligt zu sein (Abbildung 8).

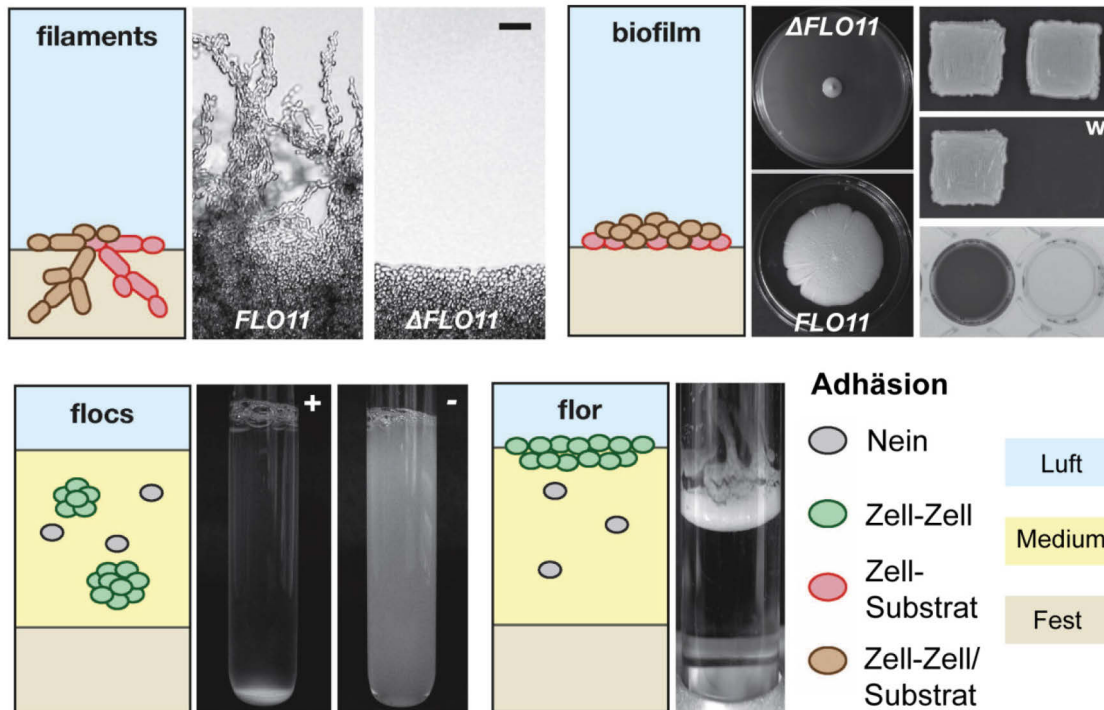


Abbildung 8 Flo11 vermittelte Phänotypen in *Saccharomyces cerevisiae*. Dargestellt ist die Entwicklung von Filamenten (*filaments*), Biofilmen (*biofilm*), Flocken (*flocs*) und Flor (*flor*). Die Bildung invasiver Filamente eines diploiden *FLO11*-exprimierenden Stammes im Vergleich mit einem  $\Delta FLO11$  Stamm. Biofilmbildung auf festem Medium eines *FLO11*-exprimierenden Stammes im Vergleich mit einem  $\Delta FLO11$  Stamm. Flocken-Bildung und Sedimentation eines flokkulierenden Stammes (+) und eines nicht flokkulierenden Stammes (-). Flor Bildung eines *FLO11*-exprimierenden Stammes an der Oberfläche einer Flüssigkultur. Die Abbildung wurde modifiziert nach Brückner und Mösch<sup>78</sup>.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Flokkulation, wie sie der oben angeführten Definition entspricht, trifft nur für die lektinartigen Flokkuline Flo1, Flo5 und Flo9 zu. Dennoch konnte für die *FLO11* exprimierenden Stämme Flockenbildung nachgewiesen werden<sup>57, 77, 79</sup>. Somit scheint sich die Flo11-vermittelte Zell-Zell-Aggregation von der klassischen Flokkulation zu unterscheiden und könnte einen Mannose- bzw. lektinunabhängigen Mechanismus darstellen, der z.B. über die Hydrophobizität der Zelloberfläche stattfinden könnte<sup>80-82</sup>.

Ein Hefe-Flor wird definiert als eine Schicht aneinander adhätierender Zellen, welche an der Luft-Medium Grenzfläche schwimmen und einen Biofilm ausbil-

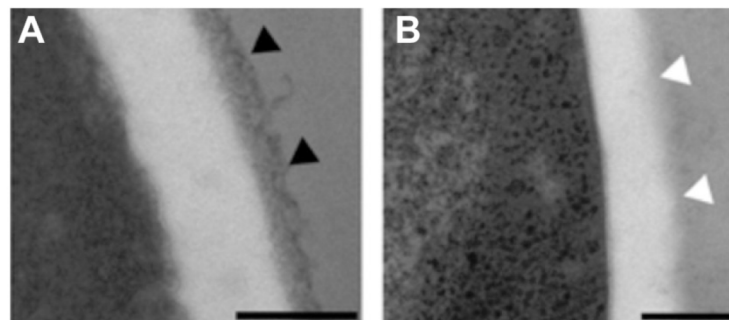
den<sup>83-86</sup>. Die Flor-Bildung wird industriell für die Produktion von Sherry-Weinen genutzt<sup>87, 88</sup>. Die Zellschicht des Flors, welche der Luft zugewandt ist, hat verstärkten Zugang zu Sauerstoff und kann dadurch andere Metabolite produzieren wie z.B. Acetaldehyd aus Ethanol. Zudem können nichtfermentative Kohlenstoffquellen wie Glycerin und Ethylacetat genutzt werden<sup>89, 90</sup>. Die Komponenten, die durch die Zellatmung entstehen, sind essentiell für das Aroma der Sherry Weine und beinhalten über ein Dutzend verschiedene Bestandteile<sup>91, 92</sup>. Flor-Hefen verwenden die Hydrophobizität ihrer Zelloberfläche, um Aggregate zu bilden. Diese Aggregate enthalten Gasblasen, wodurch die Zell-Aggregate auf der Oberfläche schwimmen<sup>93, 94</sup>. Die Flor-Bildung scheint auf der effizienten Expression von *FLO11* zu beruhen<sup>85</sup>, wobei mehrere Studien nahelegen, dass die Ausbildung der Hydrophobizität auf der Expression von *FLO11* beruht<sup>85, 95, 96</sup>. Dabei scheint auch die repetitive Region von Flo11 eine Rolle zu spielen, da Mutationen in dieser Region in Sherry Hefen beobachtet wurden<sup>97</sup>. Durch diese Längenvariation können *Saccharomyces* Hefen rasch ihr Adhäsionsverhalten ändern um das optimale Gleichgewicht zwischen adhärierenden und freien Zellen zu finden, wenn sie in Kontakt mit neuen Oberflächen kommen<sup>98</sup>.

*Saccharomyces cerevisiae* gehört nicht zu den klassischen filamentösen Pilzen, welche echte Hyphen ausbilden. Dennoch können diploide Stämme Filamente bilden, welche als Pseudohyphen bezeichnet werden. Echte Hyphen sind lange, verzweigte Strukturen, die durch kontinuierliches Wachstum der hyphenbildenden Zellen wachsen und durch Septen voneinander getrennt sind<sup>99</sup>, während Pseudohyphen einfach Ketten von langgestreckten Zellen darstellen, die nach einem Knospungsvorgang (*budding*) aneinander haften bleiben<sup>100, 101</sup>. Adhäsion an fremde Oberflächen ermöglicht es filamentbildenden Pilzen invasiv zu wachsen und z.B. feste Oberflächen wie Agar zu penetrieren<sup>100</sup>. In *S. cerevisiae* scheint es abhängig von der Expression von *FLO11*, aber auch von *FLO10* und *FIG2* zu sein<sup>57, 69, 102</sup>.

Biofilme können definiert werden als Gemeinschaft von Mikroorganismen, welche an eine Oberfläche adhärieren<sup>103</sup>. Es beinhaltet, dass sich die Zellen an eine Oberfläche anlagern können, der Biofilm wachsen kann und die Produktion einer schützenden extrazellulären, polymeren Matrix<sup>104-106</sup>. Somit müssen Strukturen geschaffen werden, welche es den Mikroorganismen ermöglichen,



fremde Oberflächen zu erkennen. *Saccharomyces cerevisiae* ist in der Lage, an biotische (z.B. Agar) und abiotische Oberflächen (z.B. Polystyrol) zu adhären, wodurch es zu einem wichtigen Modellorganismus für das Studium von Biofilmen geworden ist<sup>107, 108</sup>. Das Flokkulin Flo11 scheint bei der Etablierung von Biofilmen eine wichtige Rolle zu spielen<sup>109, 110</sup>. Zusätzlich konnte für Flo11 gezeigt werden, dass es von der Zellwand abgespalten werden kann, was eine essentielle Komponente für eine extrazelluläre Matrix darstellen könnte<sup>111</sup>. Obwohl es noch nicht vollständig geklärt ist, ob *Saccharomyces cerevisiae* Biofilme eine schützende Matrix beinhalten, konnten elektronenmikroskopische Aufnahmen nahelegen, dass solche Zellen eine Mischung aus Glukose- und Mannosepolymeren sekretieren, die die Zellen umgeben<sup>112</sup> (Abbildung 9).



**Abbildung 9** Elektronenmikroskopische Aufnahme von flokkulierenden (a) und planktonischen (b) *S. cerevisiae* Zellen<sup>112</sup>. Die flokkulierenden Zellen sind von einer elektronendichten Schicht aus Mannose und Glukose umgeben (Schwarze Pfeile), während diese Schicht bei den planktonischen Zellen fehlt (Weiße Pfeile).

*S. cerevisiae* ist auch in der Lage an bestimmte Kunststoffoberflächen wie Polystyrol, Polypropylen und Polyvinylchlorid zu binden. Diese Eigenschaft scheint auf *FLO11* und der Zunahme der Hydrophobizität, die mit der Expression dieses Adhäsins einhergeht, zu beruhen<sup>85, 107</sup>. Eine Korrelation der Zelloberflächenhydrophobizität und der Adhäsion an Plastikoberflächen scheint auch für Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10 zu bestehen<sup>79</sup>. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Plastikadhäsion vielleicht weniger eine spezifische Adhäsion als vielmehr eine generelle, durch Hydrophobizität vermittelte Wechselwirkung sein könnte bzw. dass noch weitere Faktoren eine Rolle spielen könnten.

## 1.6 Zielsetzung

Die Flo11 vermittelten Phänotypen aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigen eine große Diversität (Biofilme, Flokkulation, Flor-Bildung, Filamente), haben aber als gemeinsames Merkmal die Zell-Zell bzw. Zell-Oberflächen-Adhäsion. Ein Teil der Phänotypen lässt sich auch durch Überproduktion anderer Flokkuline hervorrufen. Die meisten Studien, die die Flo11-vermittelte Adhäsion behandeln, wurden *in vivo* durchgeführt. Dabei wurde stets mit *FLO11*-exprimierenden Stämmen gearbeitet, die das glykosylierte Volllängenprotein aus A-, B- und C-Domäne auf der Zelloberfläche präsentieren. Die Regulation der *FLO11*-Expression ist mit einer Promotorlänge von über 3 kbp sehr komplex und beinhaltet viele verschiedene Signaltransduktionswege<sup>78</sup>. Die Regulation von *FLO11* ist gut erforscht<sup>78, 113-115</sup>, der exakte Adhäsionsmechanismus hinter Flo11 ist hingegen weitgehend unbekannt. So ist z.B. nicht abschließend geklärt, ob es, ähnlich wie andere Flokkuline,  $\text{Ca}^{2+}$  und/oder Mannose-abhängig ist oder es einen anderen Mechanismus wie z.B. hydrophobe Wechselwirkungen gibt. Zudem ist der Mechanismus der Plastikadhäsion nicht bekannt.

In dieser Arbeit sollte daher versucht werden, den ungewöhnlichen Adhäsionsmechanismus der Flo11A-Flo11A Interaktion unter der Verwendung von strukturellen und biophysikalischen Methoden aufzuklären. Dafür sollten Strukturen von rekombinanten A-Domänen gelöst werden, um den Adhäsionsmechanismus auf molekularer Ebene analysieren zu können. Zudem sollte ein *in vitro* Assay etabliert werden, womit die Bindeeigenschaften der Flo11-Flo11-Interaktion quantifiziert werden können.

Eine weiterführende Frage war zudem, wie konserviert die Flo11 Domäne innerhalb der Familie der Saccharomycetaceae ist. Manche der Flo11-vermittelten Phänotypen scheinen zudem abhängig von dem verwendeten Stamm zu sein. Douglas *et al.* haben Flo11 kovalent an *beads* gekoppelt und die Adhäsion an zwei *Saccharomyces* Stämmen untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese beads spezifisch an *S. cerevisiae* var. *diastaticus* gebunden haben, nicht jedoch an *S. cerevisiae*  $\Sigma 1278b$ <sup>116</sup>. Daher sollten mögliche orthologe Flo11 Domänen aus *Komagataella pastoris* und *Saccharomyces cerevisiae*  $\Sigma 1278b$  identifiziert und charakterisiert werden.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung (Hersteller)
Äkta Prime System	( <i>GE Healthcare</i> )
Autoklav	T-Line ( <i>Fedegari</i> ), HV 110-L ( <i>HMC</i> )
Biacore System	T-100 ( <i>GE Healthcare</i> )
Bidest. Wasser-Anlage	Seralpur Pro90CN ( <i>Seral</i> )
Brutschrank	BFED-53 ( <i>Binder</i> )
CD Spektropolarimeter	Spektropolarimeter J-810 ( <i>Jasco</i> )
Chromatographiesäulen	XK 16/60-Säulenkörper ( <i>GE Healthcare</i> ), Superdex 200/75-Material ( <i>GE Healthcare</i> ), His-Trap Ni-NTA ( <i>Macherey Nagel</i> )
Digitalkamera	D70s ( <i>Nikon</i> )
Dokumentationssystem für Agarosegele	Computer E.A.S.Y. ( <i>UVP</i> ), Kamera ( <i>UVP</i> ), UV-Schirm ( <i>Herolab</i> )
Dokumentationssystem für Kristallisationsplatten	Rockimager 1000 ( <i>Formulatrix</i> )
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Eigenbau ( <i>Feinmechanische Werkstatt, FB Chemie, Philipps-Universität Marburg</i> )
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Mighty Small II SE250 / SE260 ( <i>Hoefer</i> )
Glasperlenmühle	Fastprep-24 ( <i>MP Biomedicals</i> )
Hochdruckhomogenisator	French Press ( <i>Aminco</i> ), Hochdruckzelle ( <i>Feinmechanische Werkstatt, FB Biologie, Philipps-Universität Marburg</i> )

ITC-System	ITC <sub>200</sub> ( <i>MicroCal</i> )
Kristallisationsrobotor	Cartesian MicroSys 4000-XL ( <i>Genomic Solutions</i> ), Cartesian HoneyBee 963 ( <i>Genomic Solutions</i> )
Mikroskop	B601 ( <i>Olympus</i> ), MZ 8 ( <i>Leica</i> )
NGC-System	NGC Chromatographie System ( <i>Biorad</i> )
Peristaltikpumpe	P1 ( <i>GE Healthcare</i> )
pH-Meter	Basic Meter PB-11 ( <i>Sartorius</i> )
Photometer	ND-1000 ( <i>Nanodrop</i> ), Ultrospec 3100pro ( <i>GE Healthcare</i> ), OD600 ( <i>Implen</i> )
Pipetten	Typ Research ( <i>Eppendorf</i> )
PCR Cycler	GeneAMP PCR System 2400 ( <i>Perkin Elmer</i> )
Real-Time PCR-Cycler	Rotor-Gene Q ( <i>Qiagen</i> )
Schüttelinkubatoren	Certomat IS ( <i>Sartorius</i> ), Controlled Environment Incubator Shaker ( <i>New Brunswick Scientific</i> ), Multitron ( <i>InforsHT</i> )
Spannungsquelle	EPS 300 / 301 ( <i>GE Healthcare</i> )
Synchrotron-Beamlines	Beamline BL14.1 & 14.2 BESSY-II Berlin ( <i>Helmholtz-Gesellschaft</i> ), BioSAXS Beamline BM29 Grenoble ( <i>ESRF</i> )
Waagen	PC2200 ( <i>Mettler</i> ), LabStyle 54 ( <i>Mettler Toledo</i> )
Wasserbad	NK22 ( <i>Haake</i> )
Zentrifugen	Centrifuge 5810 R ( <i>Eppendorf</i> ), J2-HS Zentrifuge mit JA10- / JA20-Rotor ( <i>Beckmann</i> ), Biofuge 15 ( <i>Heraeus</i> ), Fresco21 ( <i>Thermo Scientific</i> )

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezeichnung (<i>Hersteller</i>)</b>
cDNA Synthese Kit	iScript™ cDNA Synthesis Kit ( <i>Biorad</i> )
Einmalküvetten	67.724 ( <i>Sarstedt</i> )
Entsalzungssäulen	PD-10 Desalting Column ( <i>GE Healthcare</i> ), PD MiniTrap G25 ( <i>GE Healthcare</i> )
Farbstoff für qRT-PCR	iQ™ SYBR® Green Supermix ( <i>Biorad</i> )
Kit für die DNA-Reinigung	QIAquick PCR Purification Kit ( <i>Qiagen</i> )
Kit für Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit ( <i>Qiagen</i> )
Kit für Plasmidpräparation	QIAprep Spin Miniprep Kit ( <i>Qiagen</i> )
Konzentratoren	Amicon Ultra-15 / Amicon Ultra-5 Centrifugal Filter Devices, 10000 MWCO ( <i>Merck Millipore</i> )
Kristallisationszubehör	96-well Innovaplate ( <i>Innovadyne</i> ), VIEWseal ( <i>Greiner BIOone</i> ), SilverSeal ( <i>Greiner BIOone</i> ), 24-well Crystallization Tool mit Crystal Support ( <i>Qiagen</i> ), Micromounts ( <i>MiTeGen</i> ), CrystalCap HAT™ ( <i>Hampton Research</i> ), Cryotong / Crystal Wand™ / Micro-Tools ( <i>Hampton Research</i> )
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S 0.2 mit 0,2 µm Porengröße ( <i>Sarstedt</i> ), Filtropur S 0.45 mit 0,45 µm Porengröße ( <i>Sarstedt</i> )
Sterilfilter	Ultrafree-MC ( <i>Merck Millipore</i> ), Flaschenaufsatzfilter ( <i>Merck Millipore</i> )

## 2.3 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid (30%)	<i>Roth</i>
Agar-Agar	<i>Roth</i>
Agarose	<i>Invitrogen</i>
APS	<i>Fluka</i>
Bacto-Hefeextrakt	<i>Difco</i>
Bacto-Trypton	<i>Difco</i>
Bradford-Reagenz	<i>Biorad</i>
BSA	<i>Roth</i>
Calciumchlorid	<i>Riedel-de-Haën</i>
Coomassie-Brilliant-Blue	<i>Serva</i>
D-Glukose	<i>Sigma</i>
D-Mannose	<i>Sigma</i>
DiOC <sub>6</sub>	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
MassRuler DNA Ladder Mix	<i>Fermentas</i>
Ethanol	<i>VWR</i>
Ethidiumbromid	<i>Roth</i>
Glycerin	<i>Fluka</i>
Imidazol	<i>Merck</i>
IPTG	<i>Duchefa</i>
Kanamycin	<i>AppliChem</i>
Kristallisationsscreens	<i>Qiagen / NeXtal</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Roth</i>
Na <sub>2</sub> EDTA	<i>Merck</i>
Ni-NTA Superflow	<i>Qiagen</i>
Protein-Marker (peQGOLD)	<i>peqlab</i>

Peroxyessigsäure	<i>Sigma</i>
PMSF	<i>Fluka</i>
SDS	<i>Serva</i>
Spectinomycin	<i>AppliChem</i>
Streptomycin	<i>Sigma</i>
Surfactant P20	<i>GE Healthcare</i>
TEMED	<i>Roth</i>
Tris	<i>Roth</i>
Tween-20	<i>Roth</i>
Virkon	<i>Du Pont</i>
Weizenkleie	<i>Spielberger GmbH</i>
Yeast Nitrogen Base	<i>Roth</i>

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Merck* oder *Roth* bezogen.

## 2.4 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
BSA (10 mg/mL)	<i>New England Biolabs</i>
DNaseI	<i>Boehringer</i>
Lysozym (50 mg/mL)	<i>Boehringer</i>
<i>Nde</i> I (20 U/ $\mu$ L)	<i>New England Biolabs</i>
Phusion HiFi-DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ L)	<i>New England Biolabs</i>
T4-DNA-Ligase (400 U/ $\mu$ L)	<i>New England Biolabs</i>
Taq-Polymerase	<i>New England Biolabs</i>
<i>Xho</i> I (20 U/ $\mu$ L)	<i>New England Biolabs</i>

## 2.5 Oligonukleotide zur Genamplifikation

In dieser Arbeit wurden Gensequenzen, die für A-Domänen codieren, in den Expressionsvektor pET28a kloniert. Der Vektor pET28a codiert in seiner MCS (*Multiple Cloning Site*) für einen N- bzw. C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Durch Einfügen eines *Stop-codons* nach der Restriktionserkennungsstelle, wurden Konstrukte generiert, die lediglich über einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag verfügen (rot hervorgehoben) (Tabelle 2). Die Genlängen wurden durch Sequenzalignments und das Vorhandensein einer geraden Anzahl an Cysteinen zur Ausbildung von Disulfidbrücken festgelegt. Die Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind fett hervorgehoben. Zur Amplifizierung der ScFlo11A Mutanten wurden die Primer von ScFlo11A verwendet, da die mutierten Sequenzen bereits auf Hefeexpressionsplasmiden vorkommen, die von Dr. Stefan Brückner (FB Biologie) bereitgestellt wurden. Die Primer für ScFLO11A und ΣFLO11A wurden von Dr. Maik Veelders erstellt.

Tabelle 2 Oligonukleotide zur Klonierung von Flo11A Domänen

Gen	Forward und Reverse Primer (5'-3')
ScFLO11A	5'-CCATATGTTTCCAAGTCACTAGTTCCTAGAG-3' 5'-ACTCGAGTTAAGATGACTTCGTACCGCCAC-3'
ΣFLO11A	5'-CCATATGTTTCCAAGTCACTAGTTCCTAGAG-3' 5'-ACTCGAGTTATGGAGTTGGTACTGGAGCAC-3'
KpFLO11A1	5'-CGCGCATATGAGCTCAGGAAGACTTGCCCTAC-3' 5'-CGCGCTCGAGTTATGTAGTTGGTTCAACACCACAGTCG-3'
KpFLO11-2A	5'-CGCGCATATGGAGCAGTCTGATGTGCAACCAG-3' 5'-CGCGCTCGAGTTAACTGTGGAGGCGGCTGAG-3'
KpFLO11-3A	5'-CGCGCATATGGAGCAGTCTGATGTGCAACCAG-3' 5'-CGCGCTCGAGTTAACTGTGGAAGGGGTAGAGCATC-3'



## 2.6 Oligonukleotide für die qRT-PCR

Die Primer für die qRT-PCR wurden mit Hilfe des Programms *Primer3Plus* entworfen<sup>117</sup>. Die Produktlänge lag dabei bei etwa 100 bp mit einem Primer-Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>) von 60 °C (Tabelle 3). Die Primer wurden an das Ende des zu detektierenden Gens gesetzt, um sicher zu gehen, dass nur vollständig synthetisierte Gene gemessen werden und keine Genfragmente. *ACTIN* diene dabei als Referenz-Gen.

**Tabelle 3** Gene, Primer und Zugangscodes für die Detektion von Transkripten in *K. pastoris* GS115 mittels qRT-PCR.

Gene	Gene ID	Uniprot	Forward und reverse Primer (5'-3')
<i>KPFLO11-1</i>	8198658	C4R2D7	5'-ACCAGAGCTACCAGTGTTGTTG-3' 5'-TTGCGACACCTTCATGGATG-3'
<i>KPFLO11-2</i>	8196510	C4QZC5	5'-AGCGTCATCAGTTCCAGTTG-3' 5'-AATCAATGCCGCAACTCCAC-3'
<i>KPFLO1</i>	8199304	C4R3A8	5'-ACTCACCTCAAGTTGCTCAGAG-3' 5'-AACTGGGCGTTGTTGTTTGG-3'
<i>KPFLO2</i>	8197714	C4QYW7	5'-TGTGATGCCCAAACCTTGCAC-3' 5'-CCACCGGAACATACTTTGGAAC-3'
<i>ACTIN</i>	8197153	C4QXM9	5'-ACAGGAGCAACATCCCTGATTC-3' 5'-ATGACGTTTGCCTGCTATG-3'

## 2.7 Vektoren

### 2.7.1 pCR™2.1-TOPO™ TA Vektor

Der TOPO-TA-Vektor wird als linearisiertes DNA Molekül eingesetzt, das an den 3'-Enden einen Thymidylat (T)-Überhang besitzt und das Enzym Topoisomerase I aus dem Vacciniavirus davor kovalent gebunden hat<sup>118</sup>. Die *Taq*-Polymerase fügt bei der PCR jeweils einen Adenylat-Überhang (A) an die 3'-Enden der PCR-Produkte. Dieses A kann dann mit dem T-Überhang des TOPO-Vektors hybridisieren<sup>119, 120</sup>. Die gebundene Topoisomerase I ligiert dann das PCR-Produkt kovalent mit dem Vektor durch Transesterifizierung. Dieses System bietet eine sehr hohe Klonierungseffizienz und wurde daher bei den

Klonierungen der Flo11A Domänen als Vorstufe zur Klonierung in den Expressionsvektor pET28a eingesetzt.

### 2.7.2 pET-28a(+)-Vektor

Der Vektor pET-28a(+) wurde als Expressionsplasmid der *FLO11A* Domänen in *E. coli* eingesetzt. Es ist ein low-copy-Plasmid mit einer Kanamycin-Resistenz und einer Expressionskassette unter der Kontrolle eines T7-Promotors und eines *lac*-Repressors. Dieser Vektor kann nur in Verbindung mit Expressionsstämmen verwendet werden, welche in ihrem Genom für die T7-Polymerase codieren (Stämme mit DE3-Prophagen)<sup>121</sup>. Diese steht ebenfalls unter der Kontrolle des *lac*-Repressors. Durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) lässt sich diese Repression lösen und das entsprechende Gen kann exprimiert werden<sup>122</sup>. Desweiteren verfügt der Vektor über eine Thrombinschnittstelle zwischen dem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag und der *Multiple Cloning Site* (MCS). Somit kann durch Behandlung mit dem Enzym Thrombin der N-terminale His<sub>6</sub>-Tag proteolytisch abgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden die Flo11A Domänen zunächst mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag hergestellt.

### 2.7.3 Klonierte Konstrukte zur Expression in *E. coli*

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Expressionskonstrukte aufgelistet (Tabelle 4). Die Klonierung von pET28a-ScFlo11A (Wildtyp) und pET28a- $\Sigma$ Flo11A wurde von Dr. Maik Veelders durchgeführt. Die Templatplasmide für die Klonierung der ScFlo11A-Mutanten wurden von Dr. Stefan Brückner (FB Biologie) bereitgestellt.

Tabelle 4 Expressionsplasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Konstrukt	Quelle
pET28a-ScFlo11A	ScFlo11A <sup>F22-S211</sup> in pET28a(+)	123
pET28a-ScFlo11A <sup>Y133D, W144D, Y196D</sup>	ScFlo11A <sup>F22-S211, Y133D, W144D, Y196D</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit
pET28a-ScFlo11A <sup>Y133A, W144A, Y196A</sup>	ScFlo11A <sup>F22-S211, Y133A, W144A, Y196A</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit
pET28a-ScFlo11A <sup>Y111D, Y113D, Y118D</sup>	ScFlo11A <sup>F22-S211, Y111D, Y113D, Y118D</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit
pET28a-ScFlo11A <sup>Y111A, Y113A, Y118A</sup>	ScFlo11A <sup>F22-S211, Y111A, Y113A, Y118A</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit
pET28a-ScFlo11A <sup>W94D, Y162D</sup>	ScFlo11A <sup>F22-S211, W94D, Y162D</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit
pET28a-ScFlo11A <sup>Y111A, Y1113A, Y1118A, Y133A, Y144A, Y196A</sup>	ScFlo11A <sup>F22-S211, Y111A, Y1113A, Y1118A, Y133A, Y144A, Y196A</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit
pET28a-ScFlo11A <sup>W166D, W168D</sup>	ScFlo11A <sup>F22-S211, W166D, W168D</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit
pET28a-ScFlo11A <sup>W51D</sup>	ScFlo11A <sup>F22-S211, W51D</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit
pET28a-ΣFlo11A	ΣFlo11A <sup>F22-P226</sup> in pET28a(+)	123
pET28a-KpFlo11A1	KpFlo11A1 <sup>S23-T189</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit
pET28a-KpFlo11-2A	KpFlo11-2A <sup>E20-V189</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit
pET28a-KpFlo11-3A	KpFlo11-3A <sup>E20-V189</sup> in pET28a(+)	Diese Arbeit

## 2.8 Bakterienstämme

### 2.8.1 *E. coli* TOP10F'

Dieser Stamm überproduziert den Lac Repressor (*lacI<sup>q</sup>* Gen). Für das Blau/Weiß Screening wird den Platten IPTG zugefügt, um die Expression vom *lac* Promotor zu induzieren.

Chemisch kompetente *E. coli* TOP10F'-Zellen (*Invitrogen*) haben eine sehr hohe Transformationseffizienz und sind Bestandteil des TOPO-TA-Klonierungskits.

**Genotyp:** F' [*lacI*<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)] . *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

### 2.8.2 *E. coli* DH5 $\alpha$

Chemisch- und elektrokompente *E. coli* DH5 $\alpha$  (*Invitrogen*) wurden zur Vermehrung von Plasmiden eingesetzt.

Die *endA1* Mutation inaktiviert eine intrazelluläre Endonuklease, die ansonsten die Plasmid-DNA degradieren würde<sup>124</sup>.

Genotyp: F-  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1* *endA1* *hsdR17* (*r*<sub>k</sub><sup>-</sup>, *m*<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA* *supE44*  $\lambda$ - *thi-1* *gyrA96* *relA1*

### 2.8.3 *E. coli* SHuffle<sup>®</sup> T7 Express

*E. coli* SHuffle T7 Express wurde als Expressionsstamm für die Expression der Flo11A Domänen eingesetzt. Dieser Stamm ermöglicht die Produktion von Proteinen mit Disulfidbrücken im Cytoplasma durch ein oxidatives Zellmilieu. Zusätzlich wird konstitutiv eine chromosomale Kopie der Disulfidbrückenisomerase *DsbC* exprimiert. *DsbC* fördert die korrekte Faltung von falsch geknüpften Disulfidbrücken<sup>125, 126</sup>. Desweiteren fungiert *DsbC* auch als Chaperon, das bei der korrekten Faltung von Proteinen helfen kann<sup>127</sup>.

**Genotyp:** F' *lac*, *pro*, *lacI*Q /  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *araD139* *fhuA2* *lacZ::T7* *gene1*  $\Delta$ (*phoA*)*Pvull* *phoR* *ahpC*\* *galE* (or U) *galK*  $\lambda$ *att::pNEB3-r1-cDsbC* (*Spec*<sup>R</sup>, *lacI*<sup>q</sup>)  $\Delta$ *trxB* *rpsL150*(*Str*<sup>R</sup>)  $\Delta$ *gor*  $\Delta$ (*malF*)3 (K12 Stammhintergrund)

## 2.9 Hefestämme

### 2.9.1 *Pichia pastoris* DSMZ 70382

Genomische DNA von *Pichia pastoris* DSMZ 70382 wurde zur Amplifikation von *KpFlo11-3A* eingesetzt.

Das 9,4 Mb große Genom wurde 2008 sequenziert<sup>128</sup>.

**Genotyp:** Wildtyp-Isolat

### 2.9.2 *Pichia pastoris* GS115

Genomische DNA von *Pichia pastoris* GS115 wurde zur Klonierung von *KpFlo11A1* und *KpFlo11-2A* eingesetzt. Desweiteren diente dieser Stamm für die Transkriptom-Analysen mittels qRT-PCR.

Das 9,4 Mb große Genom wurde 2009 sequenziert<sup>13</sup>.

Der Stamm GS115 beruht auf dem Wildtyp-Isolat NRRL Y-11430, in dem eine Auxotrophie für die Aminosäure Histidin eingeführt wurde<sup>129</sup>. Diese kann als Selektionsmarker verwendet werden.

**Genotyp:** *his4* (NRRL Y-11430 Stammhintergrund)

### 2.9.3 *Saccharomyces cerevisiae* $\Sigma$ 1278b RH2662

Die Biofilm-Assays (Dr. Brückner, FB Biologie) wurden mit diesem Stamm durchgeführt. Er besitzt den *Mating type a*, eine Uracil-Auxotrophie und das Gen für das Flokkulin *FLO11* wurde deletiert<sup>130</sup>. Mit Hilfe verschiedener *FLO11* Plasmide konnten dann *FLO11* und Varianten davon gezielt exprimiert werden.

**Genotyp:** *MATa flo11 $\Delta$ ::kanR ura3-52*

### 3 Methoden

#### 3.1 Methoden der Molekularbiologie

##### 3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Stämmen erfolgte in Luria-Bertani (LB) Medium<sup>131</sup> bzw. wurde für Festmedium 2 % Agar-Agar (w/v) zugegeben. Die Medien wurden entsprechend Tabelle 5 zusammengesetzt und bei 121 °C und 2 bar 30 min lang autoklaviert.

Tabelle 5 Zusammensetzung von Luria-Bertani Medium (LB)

Komponente	Konzentration
Bacto-Trypton	10 g/L
Bacto-Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L
NaOH-Lösung (10 M)	0,4 mL/L
Dest. H <sub>2</sub> O	Ad 1 L

Die Zugabe von Selektionsmarkern (Antibiotika) erfolgte nach Abkühlung des Mediums auf ca. 55 °C. Als Selektionsmarker wurden Kanamycin (35 µg/mL; pET-28a(+)), Streptomycin (50 µg/mL; *E. coli* SHuffle T7) und Spectinomycin (12,5 µg/mL; *E. coli* SHuffle T7) verwendet. Das Wachstum der Kulturen wurde bei einer optischen Dichte (OD) von 595 nm verfolgt.

##### 3.1.2 Kultivierung von *K. pastoris* GS115

Die Kultivierung von *K. pastoris* GS115 erfolgte in YEPD Medium<sup>132</sup> (Tabelle 6). Für Festmedien wurden 2 % Agar-Agar (w/v) zugesetzt.

Bacto-Pepton und Bacto-Hefeextrakt wurden autoklaviert, D-Glukose wurde steril filtriert und anschließend zugegeben.

Tabelle 6 Zusammensetzung von YEPD Medium.

Komponente	Konzentration
Bacto-Pepton	20 g/L
Bacto-Hefeextrakt	10 g/L
D-Glukose	20 g/L
Dest. H <sub>2</sub> O	Ad 1 L

Hefezellen wurden auf YEPD-Festmedien ausgestrichen und für 15 h bei 30 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde verwendet, um 5 mL YEPD einer ÜNK anzupflanzen und diese wurde über Nacht bei 30 °C und 225 r.p.m. schüttelnd inkubiert. Die ÜNK wurde dann verwendet, um 50 mL YEPD auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 zu innokulieren. Die Zellen wurden einmal während der logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> ≈ 0,8) und während der frühen stationären Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> ≈ 2,3) geerntet. Die Kulturen wurden bei 3220 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.1.3 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mit der Calciumchlorid- bzw. Rubidiumchloridmethode<sup>133</sup>. Dazu wurde eine Übernachtskultur (ÜNK) mit einer Einzelkolonie eines *E. coli* Stammes angeimpft und der entsprechende Selektionsmarker für den Stamm zugegeben. Mit dieser ÜNK wurden 200 mL LB-medium, ebenfalls mit dem entsprechenden Selektionsmarker versetzt, in einem Verhältnis 1:100 innokuliert. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 225 r.p.m. bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,6 herangezogen. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 3220 x g (4 °C) für 20 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 60 mL TFBII-Puffer (Tabelle 7) aufgenommen und 2 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation von 10 min bei 3220 x g. und 4 °C wurde das Zellpellet in 4 mL TFBII-Puffer (Tabelle 7) resuspendiert und die Suspension zu 50 mL Portionen aliquotiert. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 7 Zusammensetzung TFBI- und TFBII-Puffer

TFBI Puffer		TFBII Puffer	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
RbCl	100 mM	RbCl	10 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM	MOPS	10 mM
KOAc	30 mM	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM	Glycerin	15 % (v/v)
Glycerin	15 % (v/v)		

### 3.1.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Hitzschock-Methode<sup>134</sup>. Dazu wurde ein 50 µL Aliquot auf Eis aufgetaut und mit ca. 20-50 ng Plasmidlösung versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 45 sec lang einem Hitzeschock bei 42 °C in einem Wasserbad ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 800 µL LB Medium wurden die Zellen 1 h bei 225 r.p.m. und 37 °C schüttelnd inkubiert. 100 µL dieser Zellsuspension wurden direkt auf einer Agarplatte mit entsprechendem Selektionsmarkern ausgestrichen. Der Rest der Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µL LB Medium resuspendiert und ebenfalls ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.1.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Methode basiert auf der selektiven alkalischen Denaturierung von chromosomaler DNA, während zirkuläre DNA doppelsträngig erhalten bleibt. Bei der anschließenden Neutralisation bildet die denaturierte chromosomale DNA ein unlösliches Aggregat, die Plasmid-DNA bleibt löslich.

4 mL einer Übernachtskultur wurden pelletiert (16200 x g, 4 min), der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µL P1-Puffer (Tabelle 8 und Tabelle 9) resuspendiert. Im Anschluss wurden 250 µL P2-Lyse-Puffer hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min wurden 350 µL P3-Neutralisations-Puffer zugegeben und der Ansatz erneut invertiert. Es folgte



eine Zentrifugation (15 min, 16200 x g, 4 °C), um präzipitierte chromosomale DNA und Zellfragmente abzutrennen. Anschließend wurden 800 µL des Überstandes mit 600 µL 2-Propanol versetzt und der Ansatz kurz vortexiert, dabei präzipitierte die gelöste Plasmid-DNA. Sie wurde pelletiert (1 h, 16200 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 300 µL Ethanol (70%) gewaschen, erneut zentrifugiert (15 min, 16200 x g, 4°C) und 30 min bei 37 °C getrocknet. Das Pellet wurde dann in 30 - 50 µL EB-Puffer gelöst und anschließend bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 8 P1 und P2 Puffer für die Plasmidpräparation**

P1 (Resuspendierung)		P2 (Lyse)	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Tris-HCl, pH 8,0	50 mM	NaOH	200 mM
EDTA	10 mM	SDS	1 % (w/v)
RNase A	100 µg/mL		

**Tabelle 9 P3 und EB Puffer für die Plasmidpräparation**

P3 (Neutralisation)		EB (Elution)	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
KOAc, pH 5,5	3 M	Tris-HCl, pH 8,5	10 mM

Sollte die gewonnene Plasmid-DNA sequenziert werden, wurde die Plasmidpräparation mit Hilfe von Plasmidextraktionskits der Firma Qiagen durchgeführt (*QIAprep Spin Miniprep Kit*).

### 3.1.6 RNA Extraktion von *K. pastoris* GS115

Die Extraktion von RNA aus der Hefe *K. pastoris* GS115 erfolgte nach einer abgewandelten Methode von Schmitt *et al.*<sup>135</sup>. Zellpellets aus 50 mL Kulturen wurden in 1 mL RNase freiem Wasser resuspendiert und 300 µL davon wurden in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß für die RNA Extraktion überführt. Diese wurde zu 1/3 mit Glaskugeln (Ø 0,25 – 0,5 mm) aufgefüllt. Dann wurden 50 µL einer 10%igen SDS-Lösung, 50 µL AE Puffer (10x) (Tabelle 10) und 600 µL Roti® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol. Die Suspension wurde für 8 min bei

4 °C vortexiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Parafilm umwickelt, um eine Evaporation des Phenols zu verhindern und bei 65 °C für 4 min bei 1400 r.p.m. geschüttelt. Nach Zugabe von 1 mL AE Puffer (1x) wurden die Reaktionsgefäße mehrfach stark invertiert und für 10 min bei 4 °C und 16200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 600 µL Roti® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben und wieder 10 min bei 16200 x g und 4 °C zentrifugiert. 500 µL des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 50 µL 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und 1 mL Ethanol (100%) zugegeben. Diese Suspension wurde für 30 min bei -20 °C inkubiert und darauffolgend bei 16200 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 500 µL Ethanol (70%) gewaschen. Das Pellet wurde dann für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µL RNase freiem Wasser aufgenommen.

**Tabelle 10 Zusammensetzung AE Puffer (1x)**

Komponente	Konzentration
Na-Acetat pH 5,3	50 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde mittels ND-1000 Spektrometer (*Nanodrop*) bestimmt. Anschließend wurden eventuell vorhandene Reste von genomischer DNA durch eine Behandlung mit DNase I (*Thermo Fisher Scientific*) beseitigt (Tabelle 11).

**Tabelle 11 DNase I Behandlung von RNA**

Komponente	Menge/Volumen
RNA	2 µg
DNase I	2 µL
DNase I Puffer	2 µL
H <sub>2</sub> O	Ad 20 µL

Zur Inaktivierung wurden 2 µL EDTA (*Thermo Fisher Scientific*) zugegeben und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde eine erneute Phe-

anol/Chloroform Extraktion durchgeführt. Das Pellet wurde hier allerdings lediglich in 30 µL RNase freiem Wasser aufgenommen.

Die erhaltene RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.1.8) auf Reinheit und Integrität überprüft.

### 3.1.7 Synthese von cDNA aus RNA

Die Synthese von cDNA (*complementary DNA*) erfolgte mit Hilfe des iScript™ cDNA Synthesis Kit (*Biorad*) (Tabelle 12). Diese Reaktion funktioniert mit Hilfe von *Random Hexamer Primern*. Das sind kurze Oligodesoxyribonukleotide zufälliger Reihenfolge [d(n)<sub>6</sub>], die an zufällige komplementäre Stellen der Ziel-RNA binden, um als Primer für die DNA-Synthese durch Reverse Transkriptase zu dienen. Die Synthese wurde in einem Thermocycler durchgeführt (Tabelle 13).

Tabelle 12 Reaktionszusammensetzung cDNA Synthese

Komponente	Menge/Volumen
5x iScript Reaktions Mix	4 µL
iScript Reverse Transkriptase	1 µL
RNA	500 ng
H <sub>2</sub> O (Nuklease-frei)	Ad 20 µL

Tabelle 13 Reaktionsbedingungen für die cDNA Synthese

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
Primeranlagerung	25	5 min
Reverse Transkription (RT)	46	20 min
Inaktivierung RT	95	1 min
Halten	4	∞

### 3.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur gezielten Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts. Sie wurde 1985 von *Mullis et al.* entwickelt<sup>136</sup>. Bei der PCR wird eine DNA-Probe in Einzelstränge getrennt und mit DNA-Polymerase, dNTPs und zwei Oligonukleotid-Primern inkubiert, deren Se-

quenzen das gewünschte DNA-Segment flankieren. Die Primer steuern die DNA-Polymerase so, dass sie komplementäre Stränge der gewünschten DNA synthetisiert. Ausgehend von einer Genkopie kann diese durch mehrfache Wiederholung des Vorgangs exponentiell vervielfältigt werden.

Alle Amplifizierungen wurden mit der *Phusion Polymerase* durchgeführt. Diese besteht aus einer Fusion aus der DNA Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* und einer *Enhancer* Domäne, welche über eine 3'→5' Exonukleaseaktivität verfügt. Dadurch reduziert sich die Fehlerrate gegenüber der DNA Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* um den Faktor 6<sup>137</sup>. Die *Phusion Polymerase* erzeugt glatte DNA-Enden (*blunt ends*).

Die Annealingtemperatur für die Primer wurde mit dem Programm OligoCalc berechnet<sup>138</sup>. Für die Berechnung der Schmelztemperatur wurde die *Nearest Neighbour Methode* gewählt<sup>139, 140</sup>.

**Tabelle 14 Zusammensetzung PCR**

Komponente	Volumen (µL)
Phusion Polymerase (2 U/µL)	0,5
Phusion Puffer HF (5x)	10
dNTPs (10 mM)	1
Primer_forward (10 µM)	2
Primer reverse (10 µM)	2
Templat DNA	1
ddH <sub>2</sub> O	Ad 50 µL

In Tabelle 14 sind die Zusammensetzungen der PCR Reaktionen zusammengestellt. Die verwendeten Template sind in Tabelle 15 aufgelistet.

**Tabelle 15** Template, die in dieser Arbeit verwendet wurden, um verschiedene Konstrukte zu generieren. Die Templat-Plasmide wurden von Dr. Stefan Brückner (FB Biologie) bereitgestellt.

Templat	Produkt
BHUM2419 (Plasmid)	ScFlo11A <sup>F22-S211, Y133D, W144D, Y196D</sup>
BHUM2756 (Plasmid)	ScFlo11A <sup>F22-S211, Y133A, W144A, Y196A</sup>
BHUM2612 (Plasmid)	ScFlo11A <sup>F22-S211, Y111D, Y113D, Y118D</sup>
BHUM2117 (Plasmid)	ScFlo11A <sup>F22-S211, Y111A, Y113A, Y118A</sup>
BHUM2413 (Plasmid)	ScFlo11A <sup>F22-S211, W94D, Y162D</sup>
BHUM2758 (Plasmid)	ScFlo11A <sup>F22-S211, Y111A, Y1113A, Y1118A, Y133A, Y144A, Y196A</sup>
BHUM2415 (Plasmid)	ScFlo11A <sup>F22-S211, W166D, W168D</sup>
BHUM2417 (Plasmid)	ScFlo11A <sup>F22-S211, W51D</sup>
Genomische DNA <i>K. pastoris</i> GS115	KpFlo11A1 <sup>S23-T189</sup>
Genomische DNA <i>K. pastoris</i> GS115	KpFlo11-2A <sup>E20-V189</sup>
Genomische DNA <i>K. pastoris</i> DSMZ 70382	KpFlo11-3A <sup>E20-V189</sup>

Die PCR Ansätze wurden zusammen pipettiert und mit Hilfe von Thermocyclern auf die entsprechenden Temperaturen gebracht. Die Bedingungen für die Amplifikation der ScFlo11A-Mutanten sind in Tabelle 16 aufgelistet und die Bedingungen für die Amplifikation der Flo11A Domänen aus *K. pastoris* in Tabelle 17.

**Tabelle 16** PCR Bedingungen für die Amplifikation der Mutanten von ScFlo11A. Diese beruhen auf der Amplifikation des Wildtyps, welches von Dr. Maik Veelders etabliert wurde<sup>123</sup>.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	5 min	1
Primeranlagerung	60	5 min	
Elongation	72	110 sec	
Denaturierung	98	45 sec	35
Primeranlagerung	60	45 sec	
Elongation	72	65 sec	
Finale Elongation	72	7 min	1

Tabelle 17 PCR Bedingungen für die Amplifikationen von *KpFlo11A1*, *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A*.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	5 min	1
Denaturierung	98	45 sec	30
Primer-Anlagerung	55	45 sec	
Elongation	72	1 min	
Finale Elongation	72	7 min	1
Halten	4	∞	1

### 3.1.9 Agarosegelelektrophorese

Die PCR Produkte wurden mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und auf das Vorhandensein von einzelnen Banden überprüft. Dazu wurden 4 µL der PCR Produkte mit 4 µL DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 1%-iges (w/v) Agarosegel in TBE-Puffer gegeben (Tabelle 18 und Tabelle 19). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 110 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad inkubiert und die banden unter UV-Licht visualisiert. Durch Vergleich mit einer DNA-Leiter, die DNA Moleküle bekannter Größe enthält, kann die Größe der PCR Produkte bestimmt werden.

Tabelle 18 Zusammensetzung TBE-puffer

Komponente	Konzentration
Tris	1 M
Borsäure	1 M
EDTA	20 mM

Tabelle 19 Zusammensetzung DNA-Probenpuffer

Komponente	Konzentration
Xylenxanol FF	0,25 % (w/v)
Ficoll Typ 400	15 % (w/v)

### 3.1.10 Klonierung

Die Klonierung der Flo11A Domänen bzw. der Mutanten von ScFlo11A erfolgte in den Expressionsvektor pET28a. Dazu wurde allerdings der Umweg über eine TOPO-Klonierung gewählt. Dies ermöglichte später eine effizientere Spaltung durch die Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI*.

Zunächst wurde eine 3'-Adenylierung der *blunt-ends* des PCR-produkts mittels Taq-Polymerase vorgenommen (Tabelle 20). Die Adenylierungsreaktion wurde anschließend für 10 min bei 68 °C inkubiert.

**Tabelle 20 Adenylierung mittels Taq-Polymerase**

Komponente	Volumen
PCR Reaktion	25 µL
ThermoPol Puffer (10x)	3 µL
dATP (100 mM)	1 µL
Taq-Polymerase (5U/µL)	1 µL

Das adenylierte PCR Produkt konnte anschließend in den TOPO-Vektor kloniert werden (Tabelle 21).

**Tabelle 21 TOPO-Klonierungsreaktion**

Komponente	Volumen
Adenylierte PCR	4 µL
Salzlösung (200 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> )	1 µL
TOPO Vektor	1 µL

Die TOPO-Klonierungsreaktion wurde bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Mit diesem Reaktionsansatz wurden chemisch kompetente *E. coli* TOP10F'-Zellen transformiert (Abschnitt 3.1.4). *E. coli* Zellen, die ein Plasmid mit Insert aufgenommen hatten wurden über ein blau-/weiß-Screening auf Selektionsplatten mit Xgal und IPTG identifiziert.

Aus positiven Transformanten wurde die Plasmid-DNA extrahiert (Abschnitt 3.1.5) und zur Sequenzierung geschickt. Plasmide, welche die korrekte Gensequenz des Inserts aufwiesen, wurden einer Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* unterzogen (Tabelle 22).

**Tabelle 22 Reaktionsbedingungen für eine Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI***

Komponente	Volumen
Plasmid	16 µL
<i>Cut Smart</i> Reaktionspuffer (10x)	3 µL
<i>NdeI</i>	2 µL
<i>XhoI</i>	2 µL
H <sub>2</sub> O	7 µL

Der Expressionsvektor pET28a wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* behandelt. Die DNA-Fragmente wurden auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und mittels Qiaquick-Gel-Extraction-Kit (*Qiagen*) aufgereinigt. In einer anschließenden Ligation wurde die gewünschte Gensequenz in den Expressionsvektor pET28a ligiert. Diese Reaktion wurde über Nacht bei 16 °C durchgeführt (Tabelle 23).

**Tabelle 23 Zusammensetzung Ligationsansatz**

Komponente	Menge/Volumen
Vektor	25 fmol
Insert	125 fmol
Ligase Puffer (10x)	2 µL
Ligase	1 µL
H <sub>2</sub> O	Ad 20 µL

Die so gewonnenen Konstrukte wurden für die Proteinexpression in *E. coli* SHuffle T7 Express eingesetzt.



### 3.1.11 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine PCR-Methode, bei der während der exponentiellen Phase der Reaktion in Echtzeit die Menge an Produkten über Fluoreszenz bestimmt werden kann. Daher eignet sich die qRT-PCR für die Analyse von RNA-Mengen als auch zum Vergleich von Genexpressionsmustern. Während der Amplifikation nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu (Abbildung 10). Der Plot besteht aus zwei Phasen, einer exponentiellen Phase, gefolgt von einer Plateau Phase. Während der exponentiellen Phase verdoppelt sich die Menge an PCR Produkten ungefähr mit jedem Zyklus. Wenn die Reaktion weiter fortschreitet, werden die Reaktionskomponenten aufgebraucht und werden zum limitierenden Faktor. An diesem Punkt wird die Plateau Phase erreicht. Im Laufe der Reaktion akkumuliert genug amplifiziertes Produkt, sodass ein detektierbares Fluoreszenzsignal entsteht, welches über dem Hintergrundlevel liegt. Die Zyklusnummer, bei der das auftritt, wird *Threshold Cycle* ( $C_T$ ) genannt. Der  $C_T$  Wert wird hauptsächlich durch die Ausgangsmenge an Template bestimmt. Wenn viel Ausgangsmaterial in der Probe vorhanden ist, sind nur wenige Zyklen erforderlich, um den *Threshold* zu passieren.

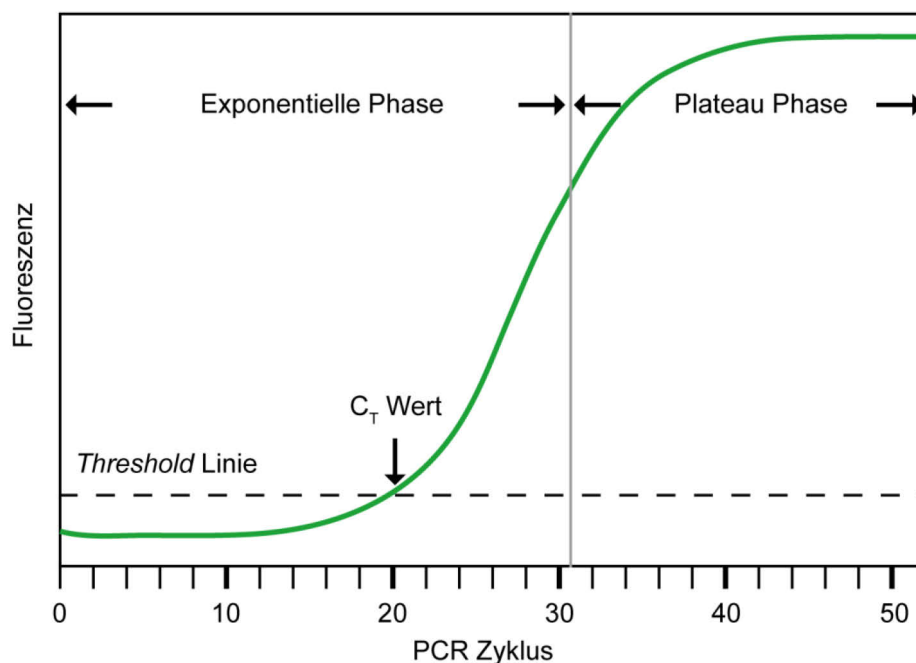


Abbildung 10 Amplifikationsplot der qRT-PCR. Erklärungen: Siehe Text. Die Abbildung wurde modifiziert nach *Real-Time PCR Applications Guide* (Biorad)<sup>141</sup>

In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR verwendet, um das Transkriptom von *K. pastoris* GS115 auf die Expression von Flokkulinen zu untersuchen. Dazu wurde die Methode der relativen Quantifizierung gewählt, wofür eine interne Kontrolle (Referenzgen) benötigt wird. Solche Referenzgene werden verwendet, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA bzw. cDNA auszugleichen. Dafür eignen sich z.B. Haushaltsgene, wobei der Mengenvergleich mit den Haushaltsgenen als Normierung bezeichnet wird.

*ACTIN* (*ACT1*) wurde als Referenzgen gewählt, da es leicht zu detektieren und seine Expression relativ unabhängig von der experimentellen Behandlung ist. Die Reaktion wurde wie in Tabelle 24 angegeben zusammenpipettiert. *SYBR*<sup>®</sup> *Green* (Biorad) diente dabei als Fluoreszenzfarbstoff.

**Tabelle 24 Zusammensetzung der qRT-PCR.**

Komponente	Konzentration/Volumen
iQ <sup>™</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Supermix	10 µL
Forward Primer	1 µL
Reverse Primer	1 µL
cDNA Templat	1 µL
H <sub>2</sub> O	7 µL

**Tabelle 25 Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR.**

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	30 sec	1
Denaturierung	95	15 sec	45
Primer-Anlagerung	60	30 sec	
Elongation	72	30 sec	

In Tabelle 25 sind die Reaktionsbedingungen der qRT-PCR aufgelistet, die mit Hilfe eines CFX96 Touch<sup>™</sup> Real-Time PCR Detektionssystems (*Biorad*) durchgeführt wurden. Im Anschluss an das PCR-Programm wurde eine Schmelzkurve durchgeführt, um auf einzelne, spezifische PCR Produkte zu untersuchen. Als Kontrollen dienten Wasser und gereinigte RNA, die beide kein Signal geben sollten. Alle Experimente wurden wenigstens in zweifacher Ausführung durch-

geführt. Die relativen Expressionsmengen wurden mit der  $\Delta C_T$ -Methode bestimmt. Die  $\Delta C_T$ -Methode ist eine modifizierte Form der *Livak*-Methode<sup>142</sup>. Dabei wird der Unterschied in den  $C_T$  Werten zwischen Referenz- und Zielgen für die Auswertung nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Verhältnis} \left( \frac{\text{Referenz}}{\text{Ziel}} \right) = 2^{C_T(\text{Referenz}) - C_T(\text{Ziel})}$$

Aufgrund dieser Berechnung wird die Expression des Referenzgens auf 1 normiert.

## 3.2 Proteinchemische Methoden

### 3.2.1 Genexpression von *FLO11A* Domänen in *E. coli*

Für die Expression rekombinanter Gene wurden *E. coli* SHuffle® T7 Express (DE3) Zellen mit den entsprechenden Vektoren transformiert und auf LB-Platten + Antibiotikum selektioniert. Übernachtskulturen (4 - 50 ml LB + Antibiotikum) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. 5 L Erlenmeyerkolben wurden mit 2 L LB + Antibiotikum befüllt und mit der Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 innokuliert. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 180 r.p.m. bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,15 – 0,2 angezogen. Anschließend wurde die Temperatur auf 12 °C gesenkt. Sobald die Kulturen eine Temperatur von 12 °C erreicht hatten bzw. eine OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 erfolgte die Genexpression durch Zugabe von 0,04 mM IPTG. Die Kulturen wurden dann 72 h bei 12 °C und 150 r.p.m. schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3951 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und die Pellets in AM-Puffer (Tabelle 26) resuspendiert (12 L Kultur /25 ml Puffer). Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Tabelle 26 Zusammensetzung AM Puffer

Komponente	Konzentration
Tris-HCl pH 8,0	0,02 M
NaCl	0,2 M

### 3.2.2 Präparativer Zellaufschluss

Bei dieser Aufschlussmethode wird die Zellsuspension unter Druck durch eine enge Öffnung (< 1 mm) gepresst, wobei durch die auftretenden Scherkräfte die Zellen zerstört werden.

Ein 30 mL-Aliquot wurde aufgetaut und mit 20  $\mu$ M EDTA, 20  $\mu$ M PMSF und 1  $\mu$ g/mL Lysozym versetzt. Die Suspension wurde anschließend in eine vorgekühlte French-Press-Zelle gegeben. Die Zellen wurden bei einem maximalen Druck von 6895 kPa (1000 psi) aufgeschlossen. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt und die Zellen anschließend für 1 h bei 22658 x g und 4 °C in einem zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (0,45  $\mu$ m) und auf eine Ni-NTA-Affinitätssäule aufgetragen.

### 3.2.3 Ni-NTA Affinitätschromatographie

Ni-NTA-Affinitätschromatographie gehört zur Metallchelatchromatographie (*immobilized metal ion affinity chromatography* oder *IMAC*), wobei Proteinmotive mit mehreren Histidin- oder Cysteinresten in geeigneter Anordnung an Säulen binden, die Metallionen der Übergangsreihe chelatiert haben<sup>143</sup>. Bei der Nickel-Chelatchromatographie werden Proteine, die N- oder C-Terminal mit einem His<sub>6</sub>-Tag fusioniert sind über Säulen isoliert, die Ni<sup>2+</sup> an eine Nitriloessigsäure-(NTA)-Kopfgruppe koordiniert haben. Ni<sup>2+</sup> kann im Austausch gegen Wasser mit zwei Histidin-Resten des Proteins interagieren. Die Elution des Proteins von der Säule erfolgt durch eine Verdrängungsreaktion, indem Imidazol (funktionelle Gruppe von Histidin) in steigender Konzentration zugegeben wird.

His-Trap Ni-NTA-Säulen (5 mL, *Machey Nagel*) wurden mit 2 Säulenvolumen (CV) dH<sub>2</sub>O und AM-Puffer an einer Peristaltikpumpe bei 4 °C und 1 ml/min äquilibriert. Auf diese vorbereitete Säule wurde der filtrierte Überstand mit einer Flussrate von 0,3 ml/min zweimal aufgetragen. Die weitere Aufreinigung wurde an einem FPLC System durchgeführt. Dafür wurde die Säule zunächst mit AM Puffer gewaschen bei einer Flussrate von 1 ml/min um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. In einem weiteren Schritt wurde die Säule mit 25 mM imidazolhaltigem AM-Puffer gewaschen um nochmals Verunreinigungen abzutrennen. Die Elution erfolgte mit 100 mM Imidazol in AM-Puffer. Die Säule wur-

de anschließend mit 2 CV 500 mM Imidazol gewaschen und nach Spülen mit 2 CV dH<sub>2</sub>O und 20 % Ethanol unter 20 % Ethanol gelagert.

### 3.2.4 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Für das Trennverhalten ist das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle verantwortlich. Moleküle ab einer bestimmten Größe können nicht in die Poren des Trenngels eindringen und eluieren zusammen mit der Lösemittelfront im Ausschlussvolumen. Kleinere Moleküle bewegen sich nicht nur ungehindert zwischen den einzelnen Teilchen der stationären Phase, sondern dringen außerdem auch in ihre Poren ein. Dadurch erfahren sie eine Verzögerung und eluieren später als größere Moleküle. Die kleinsten Komponenten haben somit die längste Aufenthaltsdauer in den Poren und werden zuletzt eluiert. Die mobile Phase dient nur als Lösemittel und hat keinen unmittelbaren Einfluss auf die Trennung.

Verwendet wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade bzw. 200 prep grade (*GE Healthcare*). Die unter 20 % Ethanol (v/v) gelagerte Säule wurde zunächst drop-to-drop an eine FPLC-Anlage angeschlossen. Die Säule wurde nun mit zwei CV ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit zwei CV Gelfiltrationspuffer äquilibriert bei einer Flussrate von 1 mL/min. Das Volumen der aufgetragenen Proteinlösung betrug maximal 1 ml. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min mit Gelfiltrationspuffer in Fraktionen von 1 mL. Die Säule wurde danach mit je 2 CV ddH<sub>2</sub>O und 20 % Ethanol gewaschen und unter 20 % Ethanol gelagert.

### 3.2.5 Ankonzentration von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen aus Affinitäts- bzw. Gelfiltrationschromatographie wurde mittels Amicon<sup>®</sup> Ultrakonzentratoren (Millipore) durchgeführt. Die Konzentratoren wurden so gewählt, dass Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 10 kDa zurück gehalten wurden. Die Konzentratoren wurden zunächst für 5 min bei 3220 x g und 4 °C mit dem jeweiligen Puffer äquilibriert. Anschließend wurden die Proteinfractionen vereinigt und mit Hilfe des Konzentrators auf das gewünschte Volumen ankonzentriert. Jeweils nach 5 min

bei 4°C und 3220 x g wurde die Lösung mit Hilfe einer automatischen Pipette durchmischt, um lokal auftretende Proteinaggregate zu verhindern.

### 3.3 Analytische Methoden

#### 3.3.1 SDS-PAGE

Proteine können mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt bzw. auf ihre Reinheit überprüft werden<sup>144</sup>. SDS-PAGE ist eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), bei der das anionische Detergens Natriumlaurylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS) eingesetzt wird. Durch Inkubation der Proteine mit SDS und Mitteln, welche Disulfid-Brücken reduzieren (2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol), werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. Die negative Ladung des SDS schirmt dabei die natürliche Ladung der Aminosäureseitenketten ab und verschafft den linearisierten Proteinen ein ähnliches Masse-Ladungsverhältnis. Bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel werden die Proteine nach diesem Verhältnis aufgetrennt. Die verwendeten Gele mit einem Acrylamidgehalt von 12% im Trenngel und 4% im Sammelgel wurden mit Hilfe eines Casters hergestellt, die Quervernetzung erfolgte mit TEMED, der Radikalstart mit APS.

Alle Proben wurden 1:4 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgekocht, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Pro Geltasche wurden 5 -10 µL Probe aufgetragen und 7 µL Proteinmarker. Die Gele liefen bei 20 mA und maximaler Spannung bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Im Trenngel betrug die Stromstärke 40 mA. Danach wurde das Gel in Färber geschwenkt und anschließend in Entfärber entfärbt.

Sammelgelpuffer		Trenngelpuffer	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Tris-HCl, pH 6,8	625 mM	Tris-HCl, pH 8,8	1,125 M
		Saccharose	30 % (w/v)

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid (30 %)	24 mL	3,33 mL
SDS-Lösung (10 % w/v)	600 µL	250 µL
Trenngelpuffer	20 mL	-
Sammelgelpuffer	-	5 mL
TEMED	60 µL	250 µL
APS (10 % w/v)	300 µL	75 µL
dH <sub>2</sub> O	15 mL	16 mL

10x SDS-Laufpuffer		2x SDS-Probenpuffer	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Tris-HCl, pH 8,8	1,125 M	Tris-HCl, pH 6,8	62,5 mM
Saccharose	30 % (w/v)	Glycerin	15 % (v/v)
		Bromphenolblau	Spatelspitze
		β-Mercaptoethanol	4 % (v/v)

### 3.3.2 Konzentrationmessung von Proteinlösungen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde durch Absorptionsmessungen bei 280 nm ( $A_{280}$ ) bestimmt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, in geringerem Maß auch Phenylalanin.

Die Messungen wurden mit einem ND-1000 Spektrometer (*Nanodrop*) bestimmt. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann anhand des Molekulargewichts und des Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{280}$ ) die Konzentration direkt bestimmt werden<sup>145</sup>.

$$E = \epsilon_{280} \times c \times d$$

$$E = \frac{\epsilon_{280} \times m}{(V \times M)} \times d$$

$$c_M = \frac{E \times M}{\epsilon_{280} \times d}$$

E: Extinktion;  $\epsilon_{280}$ : Molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm; m: Masse; c: Stoffmengenkonzentration, d: Schichtdicke; V: Volumen; M: Molekulargewicht;  $c_M$ : Massenkonzentration

### 3.3.3 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Mit Hilfe von Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) wurde das Bindeverhalten von  $\text{Ca}^{2+}$ /D-Mannose an ScFlo11A untersucht.

Mittels ITC kann die Bindungswärme gemessen werden, die während eines Bindungsexperiments zwischen Rezeptor und Ligand frei (exotherme Reaktion) oder konsumiert wird (endotherme Reaktion)<sup>146</sup>. Dazu wird das Bindungsprotein in die Probenzelle des Kalorimeters gegeben, der Ligand in die Spritze. Die Referenzzelle wird mit ddH<sub>2</sub>O befüllt. Die Bindung läuft in der Probenzelle ab. Über die Drehspritze werden Aliquots des Liganden eingegeben. Gleichzeitig wird die Spritze gedreht und mit Rührflügeln an der Spritzenspitze die Probenzelle durchmischt. Während der Messung wird die Referenzzelle elektrisch auf eine konstante Temperatur geheizt. Gleichzeitig wird die Temperaturdifferenz zwischen Referenz- und Probenzelle bestimmt. Der Heizstrom für die Probenzelle wird nun so angepasst, dass die Temperatur zwischen beiden Zellen stets gleich (isotherm) ist. Kommt es zu einer exothermen Bindung zwischen Rezeptor und Ligand, wird also in der Probenzelle Wärme freigesetzt, drosselt das Gerät den Heizstrom der Probenzelle. Die Größe der Stromabnahme ist dann äquivalent der bei der Bindung freigesetzten Wärmemenge. Die Konzentration des Liganden in der Probenzelle erhöht sich dabei stufenartig, die des Rezeptors erniedrigt sich jeweils geringfügig.

Zur Auswertung wird die Summe der Wärmeabgabe/aufnahme (kcal) pro Ligandeninjektion aufgetragen gegen die Ligandenkonzentration. Aus dieser Kurve lassen sich drei Größen berechnen: Die Anzahl der Bindungsstellen (n), die Dissoziationskonstante  $K_D$  und die pro Mol Bindungspartner freigesetzte Wärme, die Enthalpie ( $\Delta H$ ). Aus  $K_D$  und  $\Delta H$  kann nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung die Entropie des Systems ( $\Delta S$ ) bestimmt werden.

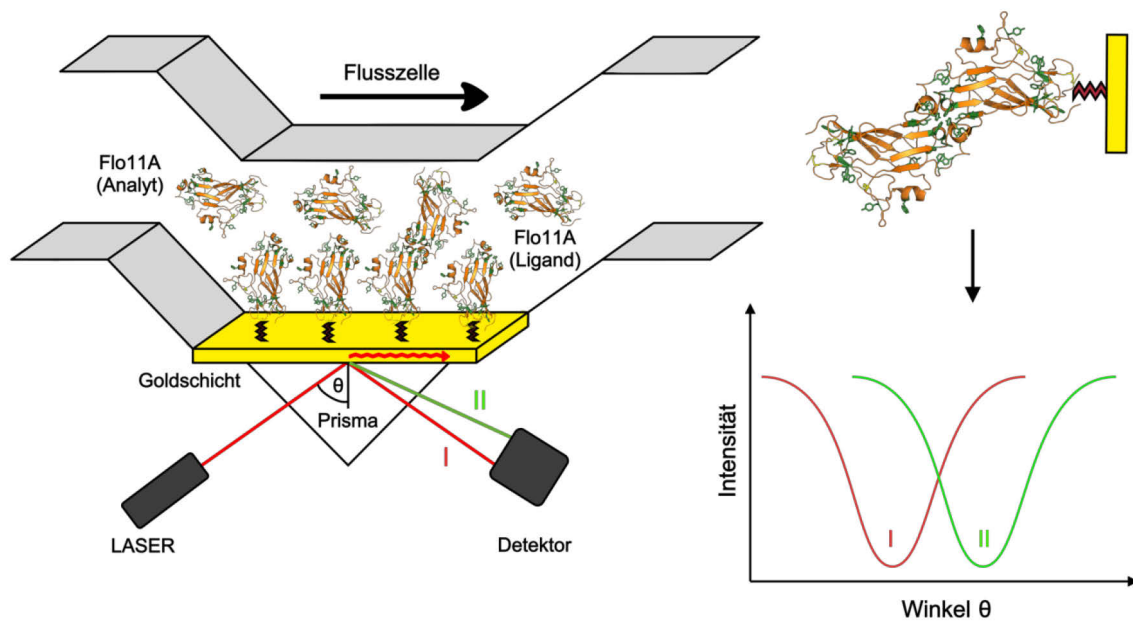


### 3.3.4 Oberflächenplasmonresonanz (*Biacore*)

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (Firmenbezeichnung *Biacore*, *Bio-molecular Interaction Analysis*) ist es möglich, die spezifische Interaktion von zwei Bindungspartnern (Assoziation, Gleichgewicht, Dissoziation) in Echtzeit zu verfolgen<sup>147</sup>. Dazu wird ein Bindungspartner auf einer Chip Oberfläche immobilisiert (Ligand), während der andere in Lösung gehalten wird (Analyt). In dieser Arbeit wurde mittels SPR (*Surface Plasmon Resonance*) die Flo11A-Flo11A Interaktion analysiert.

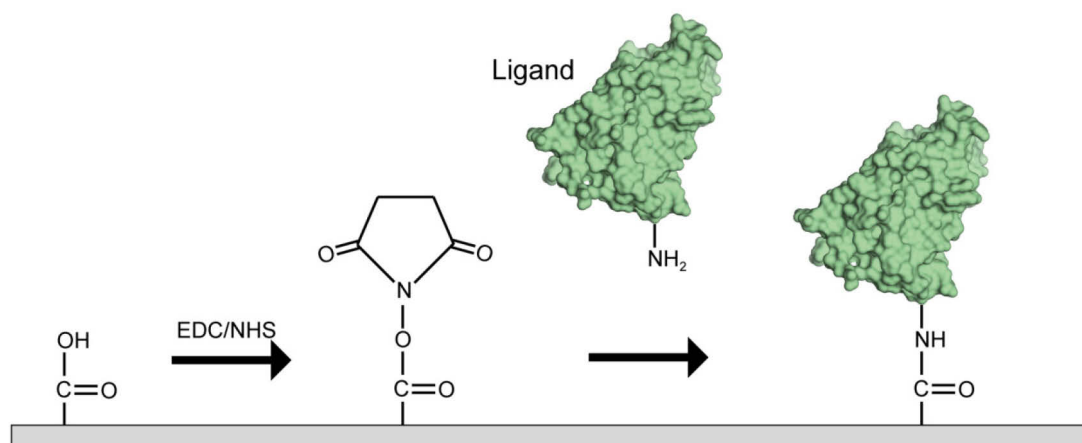
Die Hauptkomponenten des Biacore Systems sind eine optische Detektionseinheit und der Sensorchip mit vier Flusszellen<sup>148</sup>. Der Sensorchip besteht aus einer Glasoberfläche, die mit einem dünnen Goldfilm beschichtet ist. Auf der Goldoberfläche befindet sich eine carboxymethylierte Dextranoberfläche, die es ermöglicht, einen Liganden kovalent/nicht-kovalent zu binden. Die optische Detektionseinheit besteht aus einer Leuchtdiode, einem Prisma und einem Diodenarray-Detektor.

Das physikalische Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz tritt ein, wenn ein monochromatischer, planar polarisierter Lichtstrahl durch das Prisma auf die Goldoberfläche eingestrahlt wird (Abbildung 11). Wenn das Licht den *Grenzwinkel zur Totalreflexion* überschreitet, findet an der Grenzfläche zweier nicht-absorbierender Medien Totalreflexion statt<sup>149</sup>. Entlang der Grenzfläche entsteht so im optisch dünneren Medium ein *evaneszentes Feld* und auf der Goldoberfläche kommt es zur Anregung eines *Oberflächenplasmons (Plasmon Resonanz)*. Die Resonanz und damit die Lage des Winkels  $\theta$ , ist abhängig vom Brechungsindex unmittelbar über der Sensoroberfläche und damit vom Beladungsgrad. Diese Veränderung des Winkels wird in Resonanzeinheiten (*Resonance Units*, RU) ausgedrückt und ist ein Maß für die sich auf der Oberfläche befindliche Masse. Es gilt, dass 1000 RU der Anlagerung von  $1 \text{ ng mm}^{-2}$  Protein entsprechen<sup>147</sup>. Dabei resultiert eine Ablenkung des Reflexionswinkels um  $0,1^\circ$ .



**Abbildung 11** Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz am Beispiel der Flo11A-Flo11A Interaktion. Durch eine Interaktion von immobilisiertem Flo11A (Ligand) mit Flo11A in Lösung (Analyt) kommt es zu einer Änderung des Refraktionsindex und damit zu einer Verschiebung des Reflexionswinkels  $\theta$ .

Die Experimente wurden an einem BiacoreT100 System (*GE Healthcare*) durchgeführt. Die Temperatur für die Interaktionen lag stets bei 25 °C, während die Temperatur des *Sample Compartment* bei 4 °C lag. Methodisch erfolgt zuerst eine Prä-Konzentrierung des Liganden auf der Chip-Oberfläche, um die besten Bedingungen für die anschließende Immobilisierung herauszufinden. Dazu wurde 100-300 µg/mL Flo11A in 10 mM Acetatpuffern (pH 4; 4,5; 5 und 5,5) angesetzt und über die Chip-Oberfläche geschickt. Die Konzentration an Flo11A und dem besten pH-Wert wurde anschließend für die Immobilisierungs-Reaktion verwendet. Für die Immobilisierung wurde ein *Series S Sensor Chip CM5* verwendet, welcher über eine carboxymethylierte Dextranoberfläche verfügt. Die immobilisierungsreaktion wurde mit einem Immobilisierungs-Kit (*Amine Coupling Kit, GE Healthcare*) durchgeführt. Die Dextranmatrix wird zunächst mit einer Mischung aus 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert, um reaktive Succinimid-Ester zu generieren (Abbildung 12). Der Ligand wird dann über die Oberfläche geschickt, sodass die Ester spontan mit Aminogruppen oder anderen nukleophilen Gruppen reagieren und den Liganden kovalent an die Dextranoberfläche binden. Anschließend wird die Sensor Chip Oberfläche noch mit Ethanolamin behandelt, um verbliebene aktive Ester zu deaktivieren.



**Abbildung 12** Immobilisierung eines Liganden auf der Sensor Chip Oberfläche über Amin-Kupplung

Die Immobilisierung wurde mit einer Flussrate von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einer Kontaktzeit von 900 sec auf Flusszelle 2 bzw. 4 durchgeführt. Auf den Flusszellen 1 bzw. 3 wurden *Blank Immobilisierungen* (ohne Ligand) durchgeführt, damit diese dann als *Blank* von den eigentlichen Flo11A-Flo11A-Interaktionen in Flusszelle 2 bzw. 4 abgezogen werden konnten. Flo11A wurde mit einer Beladungsdichte von 4000 – 6000 RU auf der Chip Oberfläche immobilisiert und als Analyt in Konzentrationen von 0 bis 700  $\mu\text{M}$  in verschiedenen Laufpuffern eingesetzt. Die Kontaktzeit für die Assoziationen betrug 360 sec mit einer Flussrate von 10 - 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  und einer Dissoziationszeit von 360 sec für Bindungsexperimente und 600 sec für Affinitätsmessungen. Die Chip Oberfläche wurde nach jeder Injektion von Analyt mit Regenerationspuffer gewaschen mit einer Kontaktzeit von 30 sec, einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einer anschließenden Stabilisierungsperiode von 180 sec.

Laufpuffer I	Laufpuffer II
20 mM HEPES pH 6,8	20 mM Essigsäure/Acetat pH 5,5
150 mM NaCl	150 mM NaCl
0,005 % (v/v) Surfactant P20	0,005 % (v/v) Surfactant P20

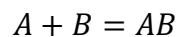
Regenerationspuffer I	Regenerationspuffer II
2 M NaCl	500 mM Tris-HCl pH 9
Ad Laufpuffer I / II	2 M NaCl

Die Auswertung erfolgte mittels Biacore T100 Evaluationssoftware Version 1.1<sup>150</sup>. Für die Affinitätsmessungen wurde ein Steady State 1:1 Modell verwendet. Dieses Modell berechnet die Dissoziationskonstante  $K_D$  für eine 1:1 Interaktion aus einem Fließgleichgewicht (*steady state*) der Bindung ( $R_{eq}$ ) gegen die Analytkonzentration ( $C$ ).

$$R_{eq} = \frac{C \times R_{max}}{K_D + C} + RI$$

Die Gleichung enthält auch einen Term ( $RI$ ), der den Massenbeitrag miteinbezieht. Dieser wird als identisch für alle Proben angenommen und verschiebt lediglich die  $R_{eq}$ -Achse.  $R_{max}$  ist die maximale Bindekapazität des Analyten auf der Oberfläche.

Für die kinetischen Betrachtungen wurde ein 1:1 Interaktionsmodell zwischen Ligand (A) und Analyt (B) verwendet.



### 3.3.5 Berechnung des Dimer-Anteils aus der $K_D$

Für eine homotypische Protein-Protein-Interaktion kann anhand der  $K_D$  (50 % Dimer) bei einer gegebenen Proteinkonzentration die Anzahl an theoretisch gebildeten dimeren Spezies berechnet werden<sup>151</sup>. Dafür werden neben dem  $K_D$  werte zwei Formeln benötigt:

$$K_D = \frac{([M_0] - 2[D])^2}{[D]} \quad (1)$$

$$Y = \frac{2[D]}{[M_0]} \quad (2)$$

Dabei ist  $[M_0]$  die Proteinkonzentration und  $[D]$  die Fraktion des gebildeten Dimers. Das Lösen der quadratischen Gleichung (1) ergibt  $[D]$  bei der gegebenen Proteinkonzentration  $[M_0]$ . Durch Einsetzen von  $[D]$  in Gleichung (2) erhält man den Anteil an theoretisch möglichem Dimer von 0 bis 1.

Trägt man  $M_0$  gegen  $Y$  auf, erhält man eine Kurve, die konzentrationsabhängig die Bildung von dimeren Spezies für die einzelnen Flo11A-Flo11A Interaktionen zeigt.

### 3.3.6 Circular dichroismus-(CD) Spektroskopie

Die CD Spektroskopie wurde eingesetzt, um die Sekundärstruktur und die thermische Stabilität der verschiedenen Flo11A Domänen zu untersuchen.

Circular dichroismus beruht auf der Wechselwirkung optisch aktiver Substanzen mit zirkular polarisiertem Licht<sup>147</sup>. Bei Proteinen handelt es sich aufgrund ihrer chiralen Strukturen um optisch aktive Moleküle. Jede Aminosäureeinheit besitzt mindestens ein optisch aktives C-Atom ( $C_\alpha$ ). Zudem zeigt ihre Gesamtkonformation Chiralität in Gestalt von  $\alpha$ -Helices (rechts- oder linksgängig) und  $\beta$ -Faltblättern (parallel oder anti-parallel)<sup>152</sup>.

Bei der CD Spektroskopie wird die unterschiedliche Absorption der links- und rechts-zirkular polarisierten Komponente von zirkular polarisiertem Licht gemessen<sup>147</sup>.

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

Dabei sind  $\varepsilon_L$  bzw.  $\varepsilon_R$  die Absorptionskoeffizienten für links- bzw. rechtszirkular polarisiertes Licht. Diese Differenz wird als Elliptizität  $\theta$  angegeben.

$$\theta(\lambda) = \text{const.} (\varepsilon_L - \varepsilon_R) c \times d$$

Hier ist  $d$  die Schichtdicke der Küvette und  $c$  die Konzentration der Probe. Die Abhängigkeit der Elliptizität  $\theta$  von der Wellenlänge  $\lambda$  wird im CD-Spektrum aufgezeichnet. Aus der gemessenen Elliptizität kann die molare Elliptizität  $[\theta]$  berechnet werden.

$$[\theta] = \frac{\theta}{c \times d \times 10} \quad \left[ \frac{\text{deg} \times \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right]$$

Der Circular dichroismus von Proteinen, insbesondere der Fern-UV-CD, wird in der Regel als mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure angegeben,  $[\theta]_{MRW}$ , basierend auf der Konzentration der Summe von Aminosäuren in der Proteinlösung, die untersucht wird<sup>153</sup>.

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta}{c \times d \times N_{As} \times 10} \quad \left[ \frac{\text{deg} \times \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right]$$

$[\theta]_{MRW}$  = mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure in  $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$

$\theta$  = gemessene Elliptizität in mdeg

$c$  = Proteinkonzentration in M

$d$  = Schichtdicke der Küvette in cm

$N_{AS}$  = Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

Die CD Spektroskopie wurde in Küvetten mit 0,1 cm Durchmesser mit einem J-810 Spektropolarimeter (JASCO) durchgeführt. Die Flo11A Domänen wurden zunächst gegen 10 mM Phosphatpuffer (pH 5,0; 6,0; 7,0 und 8,0) über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die Konzentration wurde anschließend mit den entsprechenden Puffern auf 0,5 mg/mL eingestellt. Fern-UV-Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 200 bis 240 nm bei 10 °C aufgezeichnet. Drei Spektren wurden jeweils mit einer Bandbreite von 3 nm, einer *response* von 2 sec, einem *data pitch* von 0,2 nm und einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min durchgeführt. Die Schmelzkurven wurden in einem Temperaturbereich von 10 bis 95 °C mit einer Temperatursteigerung von 1 °C/min und einem *data pitch* von 0,2 °C aufgezeichnet. Die Wellenlänge betrug hierbei 215 nm mit einer Bandbreite von 3 nm und einer *response* von 2 sec.

Die Schmelzpunktberechnungen ( $T_m$ ) wurden mittels Sigmoidfunktion (Boltzmann Funktion) berechnet.

### 3.4 Methoden der Röntgenstrukturanalyse

Die Untersuchung von Proteinstrukturen ermöglicht das Verständnis der Proteinfunktion auf molekularer Ebene. Dazu zählen neben der Kenntnis über die Faltung der Polypeptidkette, z.B. der katalytische Mechanismus eines Enzyms oder die spezifische Interaktion von Rezeptor und Ligand. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich zwei Methoden zur Analyse von Strukturen eingesetzt. Mit Hilfe röntgenkristallographischer Methoden kann die dreidimensionale Struktur von Proteinen bei atomarer Auflösung bestimmt werden, während durch Kleinkwinkelstreuung (Small-angle X-ray scattering, SAXS) die Größe, Form, Konformation und Assemblierung von Proteinen in Lösung ermittelt werden kann.

### 3.4.1 Kristallisation von Proteinen

Prinzipiell können biologische Makromoleküle jeder Art und Größe mit kristallographischen Methoden untersucht werden, wenn es gelingt, diese zu kristallisieren. In einem Proteinkristall sind einzelne Proteine an den Gitterpunkten des Kristallgitters exakt gleich angeordnet. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es möglich, durch Beugung von Röntgenstrahlen an einem Kristall ein Bild von der Anordnung der Moleküle im Kristall zu erhalten und die dreidimensionale Struktur der Proteine zu bestimmen. Die erste Struktur eines Proteins, war die von Myoglobin, die 1958 von Kendrew und Perutz aufgeklärt wurde<sup>154</sup>. Seit diesen ersten erfolgreichen Proteinkristallstrukturanalysen Ende der Fünfzigerjahre des letzten Jahrhunderts wurden bis heute (Stand März 2016) die Strukturen von 109074 Proteinen in der **Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)** hinterlegt, darunter 98154 Strukturen, die durch Röntgenkristallographie ermittelt wurden<sup>155</sup>.

<sup>156</sup>

Für die Röntgenstrukturanalyse wird das Protein in kristallinem Zustand benötigt und zwar in Form von großen, möglichst perfekt aufgebauten, einzelnen Kristallen, die auch Einkristalle genannt werden. Dabei ist die Kristallisation auch heute noch eine Technik, die auf dem Prinzip von Versuch und Irrtum beruht und deren Ergebnisse nicht vorhersagbar sind. Die Eigenschaften eines Proteins, wie Molekulargewicht, Aminosäuresequenz oder isoelektrischer Punkt, geben im Allgemeinen keinen Hinweis auf die Bedingung, die zur Kristallisation erforderlich sind<sup>147</sup>. Für ein initiales Kristallisationsscreening wurden in dieser Arbeit kommerziell erhältliche *Sparse-matrix screens* der Firma Qiagen eingesetzt, welche Bedingungen enthalten, die bereits zu erfolgreicher Kristallisation geführt haben (Tabelle 27).

**Tabelle 27** Sparse-matrix screens, die in dieser Arbeit für ein initiales Kristallisationsscreening verwendet wurden

Screen	Beschreibung
JCSG+	Literaturbekannte Bedingungen, basierend auf den Ergebnissen des <i>Joint Center for Structural Genomics (JCSG)</i> und Mitgliedern des <i>European Genomics Consortium</i> <sup>157, 158</sup>
JCSG I - IV	384 Kristallisationsbedingungen, die aus 500.000 getesteten <i>High-Throughput</i> Experimenten am JCSG die höchsten Trefferraten zeigten <sup>159</sup>
PACT	Verschiedene Kombinationen von PEG und Ionen, um den Effekt von Anionen, Kationen und pH zu testen <sup>157</sup>
Classics	Bekannte Bedingungen, beruhend auf der Arbeit von Jancarik und Kim <sup>160</sup>
Classics Lite	Classics Screen mit der Hälfte an Präzipitanskonzentration <sup>160</sup>
AmSO <sub>4</sub>	Bedingungen mit Ammoniumsulfat als Präzipitans
Anions	Verschiedene Salze und pH-Werte
Cryos	Bedingungen, die bereits Glycerin als Cryo-Protectant enthalten <sup>160</sup>
MbClass I und II	Bedingungen, mit denen hauptsächlich Membranproteine kristallisiert wurden

Die Kristallisation selbst ist ein Vorgang, bei dem Moleküle aus einer übersättigten Lösung in einen festen Phasenzustand übergehen<sup>161</sup>. Die Übersättigung einer Proteinlösung erfolgt durch Hinzufügen eines Präzipitans, das die Proteinmoleküle bei einer bestimmten Konzentration aus der Lösung verdrängt. Die Präzipitanskonzentration wird dabei möglichst langsam erhöht, entweder durch Diffusion von Wasser aus der Proteinlösung oder durch Diffusion von Präzipitans in die Proteinlösung.

Kristallisationsexperimente mit den in Tabelle 27 aufgeführten Screens wurden in einem Dampfdiffusionsverfahren im *sitting drop* durchgeführt. Dazu wurden 300 nL einer konzentrierten Proteinlösung (30 – 70 mg/mL) mit 300 nL einer Kristallisationsbedingung gemischt. Seitlich daneben befindet sich ein Reservoir der Kristallisationsbedingung mit 80 µL der Kristallisationsbedingung, sodass über die Gasphase eine Diffusion des Lösemittels stattfinden kann, was zu einer Übersättigung im Tropfen führt. Die Experimente wurden in 96-*well*-Platten



mit Hilfe eines automatischen Pipettierroboters durchgeführt (Cartesian Microsys SQ 4004 oder Honeybee 963, beide *Genomic Solutions*). Anschließend wurden die Platten mit transparenter Kunststoffolie (VIEWseal, *Greiner BIOone*) versiegelt und bei 4 oder 18 °C gelagert. Die Dokumentation der Kristallisationsexperimente erfolgte mit dem Rockmaker Dokumentationssystem (*Formulatrix*).

### 3.4.2 Optimierung von Kristallisationsbedingungen

Sollten bei diesen ersten Tests bereits Einkristalle von ausreichender Größe (20-100 µm) entstehen, so müssen die Bedingungen reproduziert bzw. optimiert werden, um möglichst große und perfekte Einkristalle für die Röntgenstrukturanalyse zu züchten<sup>162</sup>.

Die Reproduktion wurde im *hanging drop*<sup>163</sup> Verfahren mit Hilfe von EasyXtal Tools (24-well, *Qiagen*) durchgeführt. Dazu wurde ein kleines Volumen (1-2 µL) einer Proteinlösung auf ein Deckglas mit Schraubgewinde pipettiert und mit der Kristallisationsbedingung 1:1 gemischt. Dieses Deckglas wurde dann auf ein Reservoir mit 1 mL der Kristallisationsbedingung geschraubt. In diesem geschlossenen System kann sich das Volumen des Tropfens durch Dampfdiffusion verringern, da die Präzipitankonzentration nur halb so groß ist wie im Reservoir. Dadurch erhöhen sich langsam die Konzentrationen im *hanging drop*, bis eine Übersättigung und Kristallisation des Proteins eintritt.

Für die Reproduktion von ScFlo11A-Kristallen war es nötig, Kristallisationskeime in die Bedingung einzubringen. Dieser Prozess wird *Seeding* genannt und meint das Einbringen von Kristallisationsnuklei in die Phase der niedrigen Übersättigung, wo langsames Kristallwachstum möglich ist, nicht aber die spontane Keimbildung<sup>164</sup>. Für die Reproduktion von ScFlo11A-Kristallen wurde *Microseeding* in zwei unterschiedlichen Ausführungen verwendet<sup>165, 166</sup>. In der ersten Variante wurden mehrere Kristalle in einem kleinen Volumen der Kristallisationsbedingung durch kurzes Vortexieren zusammen mit einer Stahlkugel (Ø 2 mm) zerkleinert. Mit Hilfe eines Katzenschnurrhaares wurde anschließend ein Teil dieser *Seeding*-Lösung in einen neuen Kristallisationstropfen transferiert. Alternativ wurde ein bereits vorhandener Kristall bzw. Kristallfragmente mit Hilfe

eines Katzenschnurrhaares berührt und so Kristallkeime in einen neuen Tropfen eingebracht (*streak seeding*).

In einigen Fällen war die Qualität der aus den *sparse-matrix screens* gewonnenen Kristalle bereits ausreichend, um sie direkt zur Strukturlösung einzusetzen. Meistens zeigten diese Kristalle jedoch eine geringe Auflösung oder waren nicht hinreichend groß gewachsen. Morphologisch zeigte sich dies auch durch das Fehlen von sauberen Kristallkanten, Nadelbildung, *Spherulite* und Mikrokristallen. Solche Kristalle wiesen oft eine hohe Mosaizität auf, d.h. die Proteinmoleküle in dem Kristall sind ein wenig gegeneinander verkippt und versetzt. Dies kann auch durch den Einschluss von Verunreinigungen in dem Kristall eintreten. In vielen Fällen kann die Qualität der Kristalle durch Optimierungen verbessert werden<sup>167, 168</sup>. Ausgehend von der Bedingung, wo ein Treffer erzielt wurde, wurde systematisch die Zusammensetzung der Bedingung (pH-Wert, Salz, Präzipitans) variiert. Der pH-Wert wurde in Schritten von 0,1 - 0,2 Einheiten um die Bedingung herum variiert und die Konzentration von Salzen und Fällungsmitteln ebenfalls systematisch verändert. Die Optimierungen wurden sowohl in *96-well*-Platten, als auch *24-well*-Platten durchgeführt.

### 3.4.3 Vorbereiten der Kristalle für Röntgenbeugungsexperimente

Proteinkristalle enthalten große Kanäle zwischen den Proteinmolekülen, die mit der Pufferlösung gefüllt sind (meist zwischen 50 – 60 % des Kristallvolumens). Proteinkristalle sind aus diesem Grund sehr empfindlich gegenüber mechanischer Beanspruchung und müssen ständig von einer Lösung, die meist der Reservoirlösung entspricht, umgeben sein<sup>169</sup>. Mit Hilfe von CryoLoops (*Hampton Research*) wurden unter einem Mikroskop die Kristalle aus der Kristallisationslösung herausgeholt und für 1-3 min in eine Cryolösung, bestehend aus der Mutterlösung, versetzt mit einem Cryoprotectant, getaucht. Als Cryoprotectant wurde, abhängig von der Mutterlösung, entweder 25-30 % Glycerin oder 30-40 % PEG 400 eingesetzt. Der Kristall wurde anschließend in dem CryoLoop in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 3.4.4 Röntgenbeugungsexperimente

Die experimentelle Anordnung zur Röntgenbeugung besteht aus einer Röntgenstrahlungsquelle sowie einem Detektor zur Messung der gebeugten Rönt-

genstrahlen. Die Datensammlung wurde mit Röntgenstrahlung an Synchrotronen (*BESSY II*, Helm-Holtz Zentrum Berlin; *ESRF*, Grenoble) durchgeführt. Die Synchrotronenstrahlung hat den Vorteil, dass sie bei sehr kurzen Wellenlängen sehr intensiv ist und so hohe Auflösungen der Kristalle erzielt werden können.

Um möglichst viele Kristallebenen im Beugungswinkel zum Primärstrahl zu orientieren, wird der Kristall im Röntgenstrahl gedreht und es werden Beugungsbilder unter verschiedenen Winkeln aufgenommen. Zunächst wurden zwei Testbilder im Winkel von  $90^\circ$  zueinander aufgenommen. Mit Hilfe des Softwareprogramms *imosflm*<sup>170</sup> wurden die Zellparameter und Raumgruppen der Kristalle bestimmt, woraus Strategien berechnet wurden, um einen möglichst vollständigen, maximalaufgelösten Datensatz zu sammeln. Dazu wurden die Belichtungszeiten angepasst (0,1 sec – 20 min) und der Oszillationswinkel, um den der Kristall gedreht wurde ( $0,1^\circ$  -  $1,0^\circ$ ).

#### 3.4.5 Prozessierung der Datensätze

Die Prozessierung der Datensätze erfolgte mit den Programmen *XDS*<sup>171</sup> oder *imosflm*<sup>170</sup>. Bei der Prozessierung werden auf den einzelnen Bildern die Reflexe identifiziert, wodurch die Orientierungsmatrix und die Raumgruppe bestimmt werden können. Jeder Reflex wird dabei erfasst und Korrekturen für die Strahlenposition, den Detektorabstand und die Mosaizität miteinander berechnet. Die Skalierung der prozessierten Daten erfolgte mit *XSCALE*<sup>171</sup> oder *SCALA*<sup>172</sup> aus dem *CCP4-Packet*<sup>173</sup> vorgenommen. Bei der Skalierung werden die Reflexe der verschiedenen Bilder zusammengeführt und mit einem Skalierungsfaktor versehen. Hier wurden auch die Auflösungsschalen angepasst, unter Berücksichtigung der Vollständigkeit,  $I/\sigma$  (Intensität/Rausch-Verhältnis, nicht unter 2) und  $R_{\text{meas}}$  (nicht größer als 70 %) <sup>174, 175</sup>.

#### 3.4.6 Lösung des Phasenproblems durch Molekularen Ersatz (MR)

Die an dem Kristall gebeugten Röntgenstrahlen enthalten die komplette Information über die dreidimensionale Anordnung der Atome in dem Kristall. Diese Information ist in den drei Größen einer elektromagnetischen Welle (Wellenlänge, Amplitude und Phase) enthalten. Die Wellenlänge des Primärstrahls wird durch die Beugung am Kristall nicht verändert und ist damit bekannt. Die Amplitude kann durch die relative Intensität der Reflexe gemessen werden. Ei-

ne Messung der Phase ist aber nicht möglich, wodurch ein großer Teil der Informationen über die Anordnung der Atome im Kristall verloren geht<sup>176</sup>. Da die Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle der Atome gestreut werden, ergibt die Röntgenstrukturanalyse nicht sofort die exakten Atomkoordinaten, die den Positionen der Atomkerne entsprechen, sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als Elektronendichte bezeichnet wird<sup>147</sup>. Die Elektronendichte  $\rho$  an jedem Punkt  $(x, y, z)$  im Kristall lässt sich aus der Strukturfaktoramplitude  $F(h, k, l)$ , die proportional zur Quadratwurzel der gemessenen Intensität  $I$  für den Reflex  $(h, k, l)$  ist, der dazugehörigen Phase  $\alpha(h, k, l)$  und dem Volumen  $V$  der Kristallzelle berechnen:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum F(h, k, l) \times e^{i\alpha(h, k, l)} \times e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Diese Formel zeigt, dass die Bestimmung der Molekülstruktur beide Werte, den der Amplitude und den der Phase, erfordert.

Um das Phasenproblem zu lösen, wurde in dieser Arbeit die Methode des Molekularen Ersatzes (MR, *molecular replacement*) eingesetzt<sup>177</sup>. Mit Hilfe einer ähnlichen, bereits aufgeklärten Proteinstruktur können mit diesen Koordinaten die Strukturfaktoramplituden ( $F_{calc}$ ) sowie die Phasen ( $\alpha_{calc}$ ) für das Modell berechnet werden. Mit den Modellphasen und den gemessenen Strukturfaktoramplituden ( $F_{obs}$ ) kann anschließend eine Elektronendichtekarte für die neue Kristallstruktur erhalten werden. Zunächst muss dafür das bekannte Strukturmodell in der neuen Kristallzelle platziert werden, da sich sowohl die Raumgruppen als auch die Orientierung des Proteinmoleküls in der bekannten und der neuen Kristallstruktur unterscheiden. Daher muss das bekannte Strukturmodell erst korrekt in der neuen Kristallzelle platziert werden<sup>178</sup>. Dieses sechsdimensionale Suchproblem mit drei Rotations- und drei Translationsvariablen wird in zwei Schritte aufgeteilt. Dafür wird als erstes die Rotationsorientierung mithilfe der Patterson-Funktion ermittelt.

$$\rho(x, y, z) = \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \times e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Es werden zwei Patterson-Funktionen berechnet, eine mit den Strukturfaktoramplituden ( $F_{obs}$ ) aus den gemessenen Beugungsintensitäten, die andere mit

den Strukturfaktoramplituden ( $F_{calc}$ ), die aus den Atomkoordinaten des Suchmodells berechnet werden<sup>179</sup>. Die zwei Sätze von Patterson-Vektoren werden dann durch eine Produktfunktion miteinander korreliert, wobei der eine Vektorsatz gegen den anderen in kleinen Winkelschritten um alle drei Achsen gedreht wird (Rotationsfunktion). Bei einer guten Übereinstimmung gibt diese Rotationsfunktion einen hohen Wert, der eine mögliche Rotationslösung anzeigt. Anschließend wird das Suchmodell entsprechend rotiert und in kleinen Schritten durch die Kristallzelle translatiert, wobei nach jedem Schritt die Korrelation zu den experimentellen Strukturfaktoramplituden berechnet wird (Translationsfunktion). Nachdem das Suchmodell in der neuen Kristallzelle platziert wurde, kann eine Elektronendichte berechnet und mit der Korrektur und Verfeinerung der Struktur begonnen werden.

Die größte Einschränkung für die Verwendung von MR zur Strukturlösung ist das Vorhandensein eines geeigneten Suchmodells<sup>178</sup>. Die Struktur von ScFlo11A-His<sub>6</sub> konnte 2012 von Dr. Maik Veelders gelöst werden<sup>123</sup>. Dies diente in dieser Arbeit als Suchmodell für die Lösung weiterer Varianten der Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae*. ScFlo11A besitzt allerdings nur eine Sequenzidentität von 30 % zu der Flo11A1 Domäne aus *K. pastoris*. Eine direkte Lösung von KpFlo11A1 mit ScFlo11A als Suchmodell schlug daher fehl. Daher wurde mit Hilfe des Programms *MODELLER*<sup>180</sup> ein Homologiemodell von KpFlo11A1, basierend auf der Primärsequenz von KpFlo11A1 und der Struktur von ScFlo11A erstellt, was erfolgreich als Suchmodell eingesetzt werden konnte.

Die Strukturlösung durch molekularen Ersatz wurde mit dem Programm *Phaser*<sup>181</sup> und dem *Phaser-MR-GUI* aus dem *Phenix* Paket durchgeführt<sup>182</sup>. Der abschließende Bau des Atommodells erfolgte mit *Autobuild*<sup>183</sup>, ebenfalls aus dem *Phenix* Paket.

### 3.4.7 Strukturverfeinerung

Das aus *Phaser* bzw. *Autobuild* resultierende Modell enthält meist noch eine Vielzahl von Fehlern, die durch die so genannte kristallographische Verfeinerung verringert werden. Bei der Verfeinerung wird versucht, die Differenz zwischen den experimentell beobachteten Strukturfaktoramplituden ( $F_{obs}$ ) und den von dem augenblicklichen Modell berechneten  $F_{calc}$  zu minimieren<sup>147</sup>.

In dieser Arbeit wurden die Programme *REFMAC5*<sup>184</sup> (CCP4) und *phenix.refine*<sup>185</sup> (Phenix Packet) zur Verfeinerung eingesetzt, die die Atomkoordinaten leicht variieren, von dem veränderten Modell neue  $F_{calc}$  berechnen und mit den  $F_{obs}$  vergleichen. Dies wird solange wiederholt, bis die kleinsten möglichen Differenzen zwischen  $F_{obs}$  und  $F_{calc}$  erreicht werden. Die Verfeinerungsprogramme berechnen dabei verschiedene Energien, die zum Beispiel die Abweichung von den idealen Bindungsgeometrien, die abstoßenden Kräfte zwischen chemisch nicht gebundenen Atomen oder die Differenz zwischen  $F_{obs}$  und  $F_{calc}$  beschreiben und versuchen, diese Energieterme zu minimieren. Eine manuelle Inspektion der Elektronendichtekarte und des Modells erfolgte mittels *Coot*<sup>186</sup>.

Die Übereinstimmung zwischen  $F_{obs}$  und  $F_{calc}$  wird durch den kristallographischen *R*-Faktor ausgedrückt<sup>187</sup>:

$$R = \frac{\sum |F_{obs}(h, k, l) - F_{calc}(h, k, l)|}{\sum F_{obs}(h, k, l)}$$

Bei einer exakten Übereinstimmung wäre der *R*-Faktor gleich Null, für ein erstes Modell beträgt er oft zwischen 0,45 und 0,5, aber selbst für gut bestimmte und verfeinerte Proteinstrukturen liegt der *R*-Faktor noch zwischen 0,15 und 0,20<sup>188</sup>. Auch spielt die Auflösung hier eine wichtige Rolle, da mit höherer Auflösung wesentlich mehr Daten ( $F_{obs}$ ) zur Verfügung stehen. Die Abweichungen beruhen nicht nur auf dem Messfehler der Beugungsdaten, sondern vor allem auf der nicht perfekten kristallinen Ordnung und den kleinen Unterschieden zwischen den Strukturen der einzelnen Proteinmoleküle im Kristall. Das bedeutet, dass das verfeinerte Modell einen Mittelwert zwischen den minimal verschiedenen Konformationen und Orientierungen der Moleküle im Kristall darstellt.

Zur weiteren Kontrolle der Strukturverfeinerung wird eine Kreuzvalidierungsmethode eingesetzt, bei der ein kleiner Teil der Beugungsdaten (5 % oder 2000 Reflexe) von den Strukturverfeinerungen ausgeschlossen wird. Diese Reflexe werden nur für die Berechnung des freien *R*-Faktors ( $R_{free}$ ) verwendet, der wie der *R*-Faktor definiert ist<sup>189</sup>. Die Abweichung des freien *R*-Faktors vom *R*-Faktor sollte nicht mehr als 3-8 % betragen.

Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit *PyMOL*<sup>190</sup> und die Berechnung des elektrostatischen Oberflächenpotentials mit *APBS*<sup>191</sup> als *PyMOL*

*Plugin*. Nach Abschluss der Verfeinerung und Analyse der Struktur werden die Atomkoordinaten und Strukturfaktoren in der *Protein Data Bank (PDB)* deponiert<sup>155</sup>.

### 3.4.8 Kleinwinkelstreuung (SAXS)

SAXS (*Small-angle-X-ray scattering*) basiert ebenso wie die Röntgenkristallographie auf dem Einsatz von Röntgenstrahlen, aber im Gegensatz zur Diffraktion können hier Moleküle in Lösung analysiert werden<sup>192</sup>. Als Röntgen-Kleinwinkelstreuung bezeichnet man die elastische Streuung (kein Energieverlust nach Beugung) monochromatischer Röntgenstrahlung unter kleinen Streuwinkeln<sup>193</sup>. Bei der Durchdringung von Materie mit Röntgenstrahlen werden die Elektronen durch die einfallende Welle in Schwingungen versetzt und senden Sekundärwellen aus. Wird eine Probe mit kolloidalen Strukturen von Röntgenlicht durchstrahlt und sind die Abmessungen dieser kolloidalen Strukturen sehr viel größer als die Wellenlänge der Röntgenstrahlung, dann tritt Interferenz dieser Sekundärwellen bei kleinen Winkeln auf (Röntgen-Kleinwinkelstreuung). Da die Röntgenstrahlung von den Elektronen gestreut wird, tritt Kleinwinkelstreuung immer dann auf, wenn sich Bereiche von kolloidalen Abmessungen in ihrer Elektronendichte unterscheiden, z.B. bei Makromolekülen in Lösung.

Der Aufbau eines SAXS Experiments ist vergleichsweise einfach: Eine homogene, kolloidale Proteinlösung wird monochromatischer Röntgenstrahlung ausgesetzt und die Intensität der gebeugten Röntgenstrahlen wird detektiert. Das Beugungsmuster des Solvens wird ebenfalls aufgenommen und von der Messung der Protein-Solvens-Lösung subtrahiert, sodass nur das Signal des Proteins analysiert werden kann. Aus dem Beugungsmuster können dann Informationen über das Molekulargewicht, Größe, Partikelvolumen ( $V_p$ ), maximale Partikeldimensionen ( $D_{max}$ ), sowie dem Gyrationradius ( $R_g$ ) ermittelt werden. Der Auflösungsbereich dieser Methode liegt bei etwa 50 bis 10 Å<sup>194</sup>. Aus der erhaltenen Streukurve können hauptsächlich drei Plots ermittelt werden, die unterschiedliche Informationen liefern: Die *pair-distribution function*, der *Guinier Plot* und der *Kratky Plot*<sup>195</sup>. Die Streukurve besteht aus einem Plot von  $I(q)$  gegen  $q$ , wobei  $I$  die Intensität des Beugungsmusters darstellt und  $q$  die Amplitude des Streuvektors bzw. Impulsübertragung:

$$q = \frac{(4\pi \sin\theta)}{\lambda}$$

Dabei ist  $2\theta$  der Beugungswinkel und  $\lambda$  die Wellenlänge des Röntgenstrahls in  $\text{nm}^{-1}$  oder  $\text{\AA}^{-1}$ . Dieser Plot kann zwar erste Informationen zur Datenqualität liefern, dennoch stellt der *Guinier Plot* die erste Qualitätskontrolle dar. Bei einem *Guinier Plot* wird der natürliche Logarithmus der Streuintensität,  $I(q)$ , gegen die Amplitude des Streuvektors in Quadrat,  $q^2$ , aufgetragen. Daraus kann dann der Gyrationradius oder Trägheitsradius ( $R_g$ ) berechnet werden. Der  $R_g$  beschreibt die Volumenverteilung in einer Probe und kann Informationen über die Partikelgröße liefern. Desweiteren können Informationen über Aggregation gewonnen werden.

Die *pair-distribution function* kann direkt durch eine Fourier Transformation von der Streukurve erhalten werden:

$$I(q) \text{ vs } q \xrightarrow{\text{Fourier Transformation}} P(r) \text{ vs } r$$

Die *pair-distribution function*,  $P(r)$ , liefert Informationen über die Partikelabstände in der Probe. Über die  $P(r)$  können die Form des Proteins (3D Modelle) und der maximale Partikelabstand,  $D_{max}$ , bestimmt werden.  $D_{max}$  ist der Punkt, wo  $P(r) = 0$ , wenn  $r > 0$ .

Über die Flexibilität des Proteins gibt der Kratky Plot ( $I(q) \cdot q^2$  gegen  $q$ ) Auskunft. Bei kleinen Winkeln ergibt sich für globuläre Proteine eine glockenartige Kurve mit einem gut definierten Maximum<sup>192</sup>.

Die SAXS Datensätze wurden an der Bio-SAXS Beamline BM29 am ESRF in Grenoble (Frankreich) aufgenommen<sup>196, 197</sup>. Die Wellenlänge betrug  $\lambda=1,0 \text{ \AA}$  und der Detektorabstand 2,43 m, woraus sich Streuvektoren,  $q$ , von  $0,0025 \text{ \AA}^{-1}$  bis  $0,50 \text{ \AA}^{-1}$  ergaben. Alle Experimente wurden bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt und die Daten wurden mit dem ATSAS 2.6.0 Software Paket prozessiert<sup>198</sup>. Die Messungen wurden in 20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl und 20 mM Acetat pH 5,5, 300 mM NaCl durchgeführt. Die *ab initio* Modelle der Proteinhüllen wurden mittels *Dammi*<sup>199</sup> generiert. Für die monomeren Spezies wurde P1 als Symmetrie verwendet und für dimere Spezies P2.



## 4 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene bzw. Proteine stammen alle aus der Familie der Saccharomycetaceae und zeigen übereinstimmend einen Aufbau aus drei Domänen. Der Fokus lag dabei auf den N-terminalen A-Domänen, die auf ihre adhäsiven Eigenschaften untersucht werden sollten. Es wurden zwei Flo11A Domänen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) und drei Flo11A Domänen aus *Komagataella pastoris* (Kp) charakterisiert. Bis auf KpFlo11 besitzen alle fünf untersuchten Proteine jeweils eine A-Domäne. KpFlo11 hingegen besitzt zwei Flo11A Domänen, von denen die erste analysiert wurde. Die FLO5-artigen Gene *KpFLO1* und *KpFLO2* wurden hinsichtlich ihrer Expression in *K. pastoris* untersucht. Alle sieben Proteine sind über einen C-terminalen GPI-Rest nach Transglykosylierung in der Zellwand verankert. Für KpFlo11 wurde es zwar nicht in der Datenbank annotiert, aber experimentell nachgewiesen<sup>200</sup>.

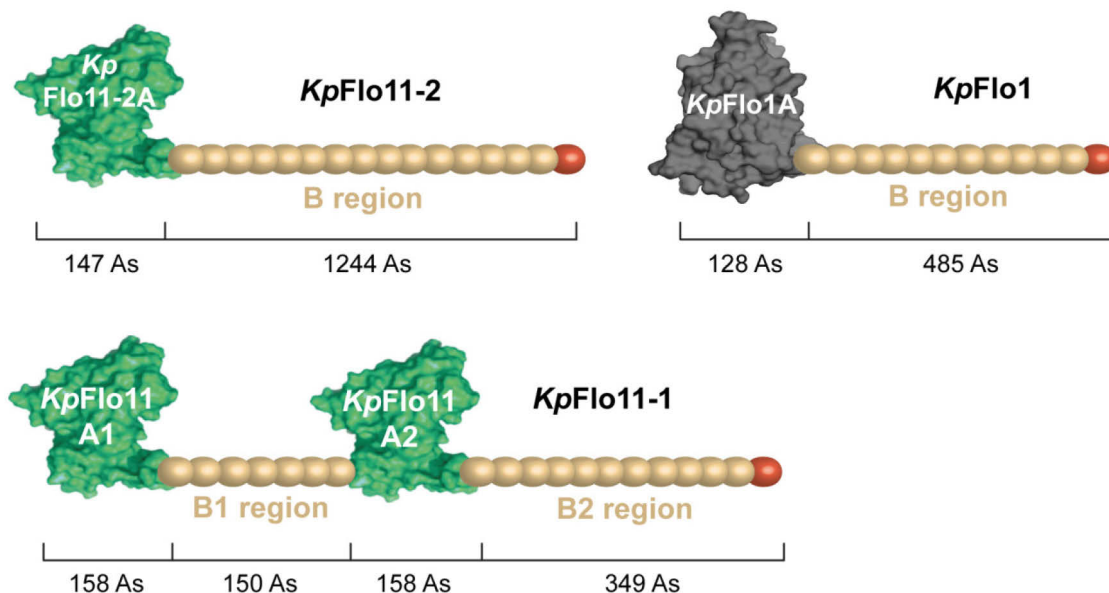
**Tabelle 28** Beschreibung und Zugangsinformationen zu den in dieser Arbeit untersuchten Hefeproteinen. Stammbeschreibungen und Zugangscodes stammen von UniProt<sup>201</sup>.

Protein	Domäne	Organismus	UniProt	ID
Flo11A	Flo11	<i>S. cerevisiae</i> S288C	P08640	NP_012284.3
ΣFlo11A	Flo11	<i>S. cerevisiae</i> Σ1278b	E9P9G2	ABS87372
KpFlo11A1	Flo11	<i>K. pastoris</i> GS115	C4R2D7	XP_002491941
KpFlo11-2A	Flo11	<i>K. pastoris</i> GS115	C4QZC5	XP_002490879
KpFlo11-3A	Flo11	<i>K. pastoris</i> DSMZ 70382	-	CABH01000019.1
KpFlo1	Flo5	<i>K. pastoris</i> GS115	C4R3A8	XP_002492223
KpFlo2	Flo5	<i>K. pastoris</i> GS115	C4QYW7	XP_002490721.1

**Tabelle 29** Physikochemische Parameter der untersuchten A-Domänen. MW (Molekulargewicht), Theoretischer pI (Theoret. pI) und Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) stammen von ExPASy ProtParam<sup>202</sup>

Protein-His <sub>6</sub>	Aminosäuren	MW/Da	Theoret. pI	$\epsilon_{280}/M^{-1}cm^{-1}$
Flo11A	F22 - S211	23731,0	5,23	55265
$\Sigma$ Flo11A	F22 - P226	25588,0	4,39	58370
KpFlo11A1	S23 - T189	21989,4	5,51	59400
KpFlo11-2A	E20 - V189	21467,6	5,90	49765
KpFlo11-3A	E20 - V189	21572,7	5,84	49765

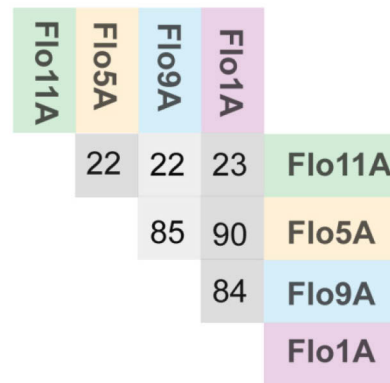
In Tabelle 28 und Tabelle 29 sind die untersuchten Domänen und ihre physikochemischen Parameter zusammengefasst. Repräsentative Domänenorganisationen aus A-, B- und C-Domäne sind in Abbildung 13 dargestellt. Die allgemeine Domänenstruktur von KpFlo11-2 entspricht der von Flo11A,  $\Sigma$ Flo11A und KpFlo11-3A. KpFlo11-1 besitzt zwei Flo11 Domänen, welche von einer B Region unterbrochen werden. Die Domänenarchitektur von KpFlo1 entspricht der von KpFlo2.



**Abbildung 13** Domänenarchitektur einiger Flo11-artiger und PA14-artiger Proteine. Die A-Domäne ist in grün bzw. grau dargestellt, die repeat-reiche Serin- und Threoninreiche B-Domäne in hellbraun und die C-Domäne in rot. Die in grün dargestellte Oberflächenansicht der A-Domäne von Flo11 entspricht der Kristallstruktur von ScFlo11A (PDB code 4UYT), während die in grau dargestellte A-Domäne als Vertreter der Flo5-Familie der Epa1A Struktur entspricht (PDB code 4AF9). As= Aminosäurereste.

## 4.1 Phylogenetische Einordnung der Flo11 Domäne

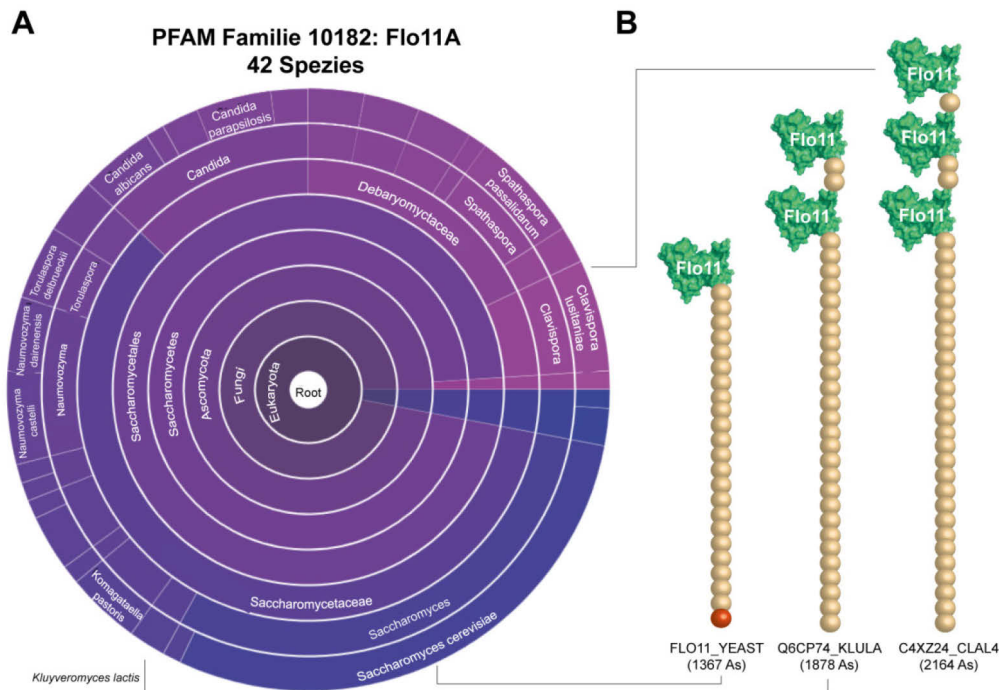
Die Flo11 Domäne aus *S. cerevisiae* S288C hat mit anderen Flokkulinen wie z.B. Flo5, Flo1 oder Flo9 nur wenig gemeinsam und weist auch nur eine geringe Sequenzidentität von ca. 20 % zu diesen auf (Abbildung 14).



**Abbildung 14** Sequenzidentitäten von A-Domänen innerhalb der Flokkulin Familie. Flo11A zeigt zu anderen Flokkulinen lediglich eine Sequenzidentität von ca. 22 %. Die Angaben beziehen sich auf die prozentuale Sequenzidentität und wurden mittels *Clustal Omega* berechnet<sup>203</sup>.

Die N-terminale A-Domäne von Flo11 zeigt zudem keine Homologie zu der PA14/Flo5 Proteinfamilie, der die anderen Flokkuline angehören (Pfam Eintrag PF07691) und repräsentiert dagegen eine eigene Pfam Familie (PF10182) (Abbildung 15A). Diese beinhaltet zurzeit 112 Mitglieder (Stand: Februar 2016). Dabei werden Flo11A Domänen ausschließlich in der Abteilung der Schlauchpilze (Ascomycota) in den Ordnungen der Echten Hefen (Saccharomycetales) und der Spalthefen (Schizosaccharomycetales) gefunden. Zu den Echten Hefen gehören z.B. die Zuckerhefen (*Saccharomyces*) mit der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) als bekanntestem Vertreter. Die Spalthefen vermehren sich nicht durch Sprossung, sondern durch Ausbildung einer Querwand. Flo11A Domänen konnten in zwei Spezies der Spalthefen gefunden werden: *Schizosaccharomyces pombe* und *Schizosaccharomyces cryophilus*.

Im Großteil dieser Mitglieder der Flo11 Familie wird die Flo11 Domäne am N-Terminus eines GPI-verankerten Zellwandproteins gefunden. Einige Hefen wie z.B. *Clavispora lusitaniae* oder *Spathaspora passalidarum* haben bis zu drei aufeinanderfolgende Flo11A Domänen (Abbildung 15B). Diese sind durch kurze *low complexity* Regionen voneinander getrennt.



**Abbildung 15** Phylogenetische Analyse der Flo11 Familie. (A) Phylogenetische Darstellung der Flo11 Familie. Die Flo11A Domäne kommt ausschließlich in der Abteilung der Ascomycota in den Ordnungen der Saccharomycetales und Schizosaccharomycetales vor. Die Grafik wurde mittels Pfam Version 27.0 erstellt<sup>204</sup>. (B) Verschiedene Architekturen pilzlicher Zellwandproteine, die eine Flo11 Domäne beinhalten. Die *repeat*-reichen B Regionen sind als kleine Kugeln dargestellt. Für Flo11 aus *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass die C Region eine GPI-Verankerungssequenz darstellt.

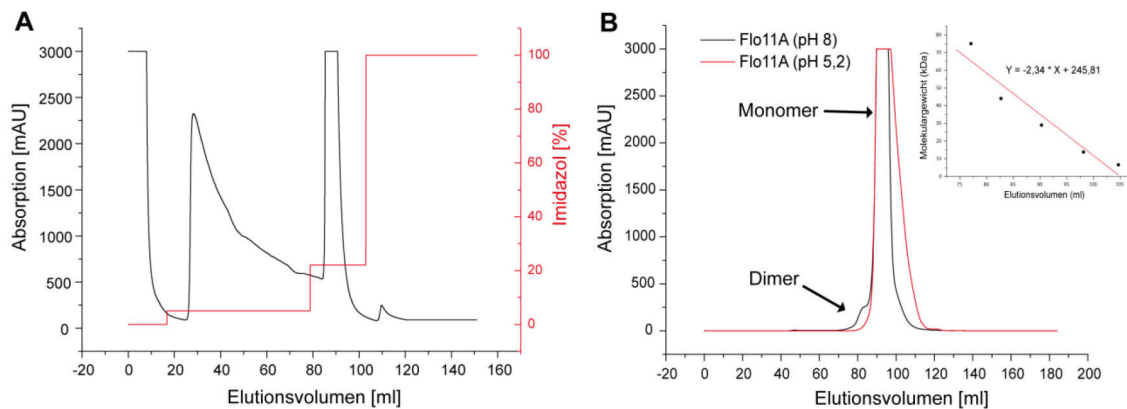
## 4.2 Die Flo11A Domäne aus *Saccharomyces cerevisiae* S288C

Zu Beginn dieser Arbeit lag das Gen für die *FLO11A* Domäne aus *Saccharomyces cerevisiae* S288C bereits kloniert mit Codierung für einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag in dem Expressionsvektor pET28a vor. Diese Arbeiten wurden von Dr. Maik Veelders durchgeführt<sup>205</sup>.

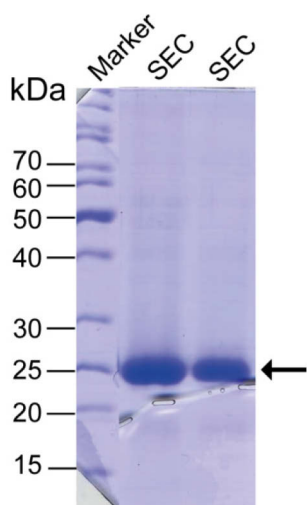
### 4.2.1 Produktion und Aufreinigung von ScFlo11A

Die Produktion der Flo11A Domäne erfolgte in *E. coli* SHuffle<sup>®</sup> T7 Express Zellen. Diese sind in der Lage, durch konstitutive Expression der Disulfidbrückenisomerase *DsbC*, Proteine mit Disulfidbrücken im Cytoplasma zu produzieren. Dazu wurde eine Hauptkultur im Verhältnis 1:100 mit einer ÜNK inokuliert, die Zellen schüttelnd bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,15 bis 0,2 angezogen und anschließend die Temperatur auf 12 °C erniedrigt. Die Expression wurde bei einer OD<sub>600</sub> 0,6 bis 0,8 mit 0,04 mM IPTG induziert und die Zellen nach 72 h

geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte mittels French-Press und der Überstand wurde nach erfolgter Zentrifugation auf eine Ni-NTA-Affinitätschromatographiesäule aufgetragen. Dabei erfolgte die Elution von Flo11A-His<sub>6</sub> mittels Imidazol in einem Stufengradient bei 100 mM, während unspezifisch gebundene Proteine mit einer Imidazol-Konzentration von 25 mM gewaschen wurden (Abbildung 16A). Die so erhaltenen Fraktionen wurden gesammelt, ankonzentriert und auf eine präparative Größenausschlusssäule aufgetragen (Abbildung 16B).



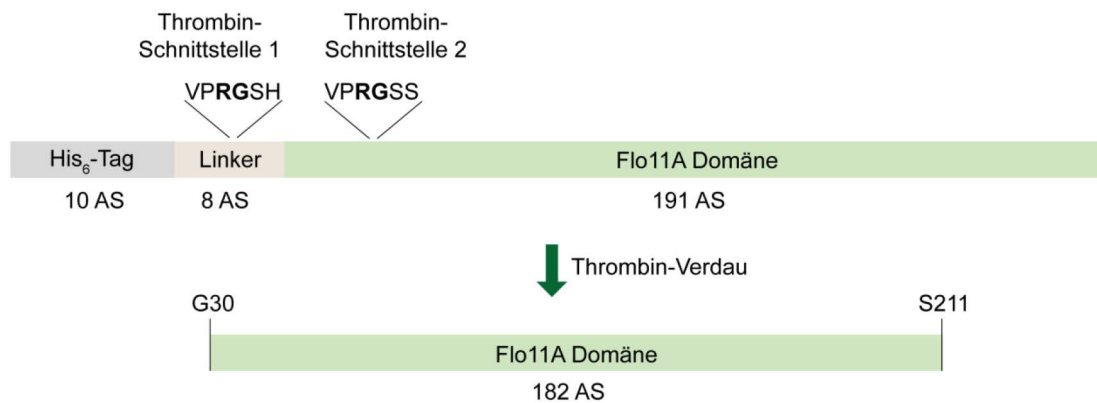
**Abbildung 16** Ni-NTA und Größenausschlusschromatographie von Flo11A aus *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Die Ni-NTA Chromatographie erfolgte mit einem Stufengradienten und die Elution von Flo11A erfolgte bei einer Imidazolkonzentration von 100 mM. (B) Die Größenausschlusschromatographie wurde mit einer 16/60 Superdex 200 durchgeführt. Dabei erfolgte die Elution von monodispersen Flo11A bei einem Elutionsvolumen von ca. 90 mL, während eine sehr kleine Schulter bei ca. 80 mL der dimeren Spezies von Flo11A zugeordnet werden konnte. Das Inlay zeigt die Kalibrierung der Säule.



**Abbildung 17** SDS-PAGE von Flo11A nach Gelfiltration (SEC, Pfeil).

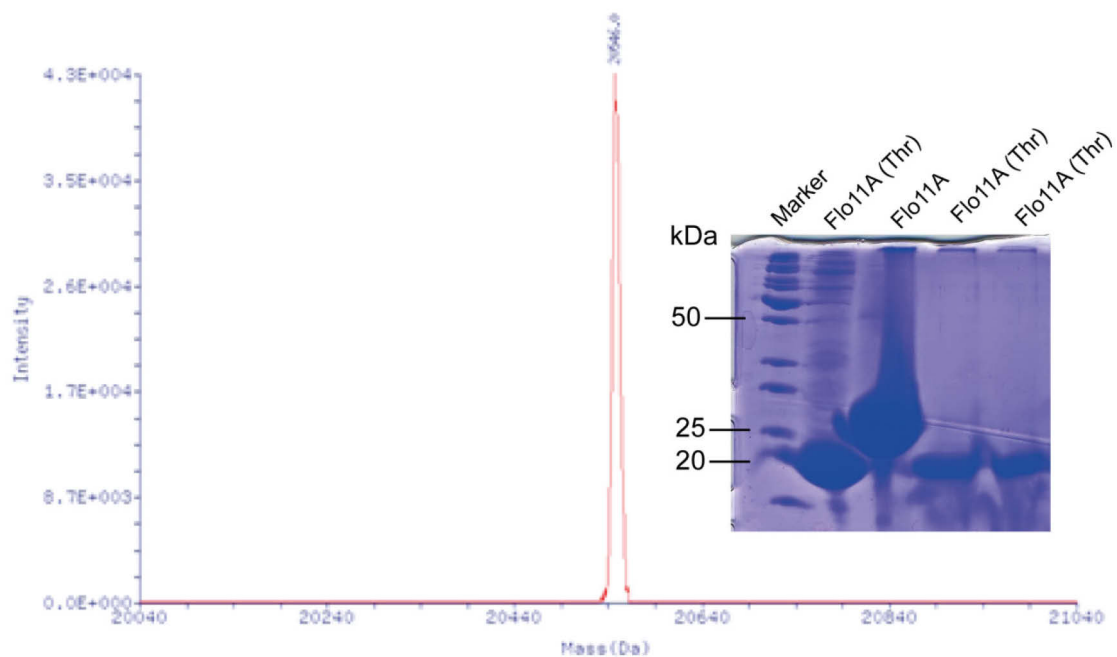
Die Elution mittels Gelfiltration erfolgte mit Laufpuffern bei pH 5,2 und 8. Dabei zeigte sich pH-unabhängig eine kleine Schulter, die bei ca. 80 mL eluierte und der dimeren Spezies von Flo11 zugerechnet werden konnte. Der Hauptanteil eluierte jedoch als Monomer bei einem Elutionsvolumen von ca. 90 mL. Dieses wurde anschließend per SDS-PAGE analysiert (Abbildung 17). Die Ausbeute an Protein lag dabei bei ca. 10 bis 14 mg/mL Kultur.

Flo11A wurde mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag produziert. Dieser *Tag* besteht aus sechs aufeinander folgenden Histidinen und ermöglicht die Aufreinigung über Ni-NTA. Für die Kristallisation könnte sich dieser *Tag* allerdings negativ auswirken, da eventuell Kristallkontakte verhindert werden könnten. Flo11A-His<sub>6</sub> besitzt zwei Erkennungsschnittstellen für Thrombin. Die erste stammt von dem verwendeten Expressionsvektor pET28a, die zweite kommt nativ in der Sequenz von Flo11A vor (Abbildung 18).



**Abbildung 18** Thrombin-Erkennungsstellen von Flo11A-His<sub>6</sub> aus *Saccharomyces cerevisiae* S288C. Die erste Schnittstelle kommt durch Klonierung in den Expressionsvektor pET28a zustande, die zweite kommt natürlich in der Sequenz von Flo11A vor. Der His<sub>6</sub>-tag ist in grau dargestellt und die Linkerregion des Vektors in hellbraun. AS = Aminosäuren.

Daher wurde das Protein nach Aufreinigung durch Ni-NTA einem Verdau mittels Thrombin unterzogen. Es wurden 10 Units Thrombin pro mg Flo11A eingesetzt und über Nacht bei 4 °C verdaut. Der Verdau wurde dann auf eine Ni-NTA Säule aufgetragen und der Durchfluss gesammelt, sodass das His-*Tag* auf der Säule verblieb und das geschnittene Flo11A nicht an die Säule binden konnte. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Massenspektrometrie und SDS-PAGE auf korrekte proteolytische Prozessierung überprüft (Abbildung 19). Anschließend wurden die Fraktionen gesammelt und eine Gelfiltration durchgeführt.



**Abbildung 19** Analyse der proteolytischen Prozessierung von Flo11A durch Thrombin. Die Vollmassenbestimmung zeigt, dass sauberes, vollständig prozessiertes Flo11A erhalten wurde. Die Fraktionen wurden auch per SDS-PAGE analysiert, wo ein deutlicher Größenunterschied zwischen Thrombin-verdaulichem Flo11 und nichtbehandeltem Flo11 besteht (Thr = Thrombin). Durchgeführt über ICR-MS, Service-Abteilung Massenspektrometrie, Universität Marburg, FB Chemie.

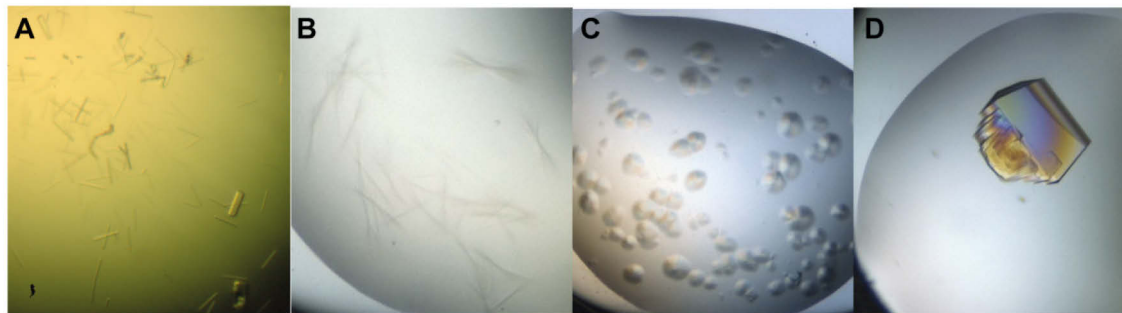
#### 4.2.2 Kristallisation von Flo11A-His<sub>6</sub> und Flo11A

Die ersten Kristallisationsversuche von Flo11A-His<sub>6</sub> wurden von Dr. Maik Veelders durchgeführt<sup>205</sup>. Dabei zeigte das Protein in Tris-Puffer (pH 8) eine sehr hohe Löslichkeit von mehr als 100 mg/mL, sodass die meisten Tropfen in den verwendeten Kristallisationsscreens klar blieben. Daher wurde während der Gelfiltration Flo11A-His<sub>6</sub> in 100 mM Phosphatpuffer pH 5,2 eluiert, was dem isoelektrischen Punkt von Flo11A-His<sub>6</sub> entspricht. So sollte die Löslichkeit herabgesetzt und die Kristallisation begünstigt werden. Durch diese Methode konnte ein erster Kristall in der Bedingung Nr. 43 des MBC II Screens (Tabelle 30) von Flo11A-His<sub>6</sub> erhalten werden, welcher jedoch nur durch *seeding* reproduziert werden konnte.



In dieser Arbeit sollte nun versucht werden, die Kristallisation von Flo11A ohne His-Tag zu reproduzieren. Dabei zeigte sich schnell, dass eine Reproduktion in Phosphatpuffer ausschließlich zu Salzkristallen führte. Daher wurde für die Elution in der Größenausschlusschromatographie ein Essigsäure-Acetatpuffer gewählt (20 mM, pH 4,17), da Flo11A ohne His-Tag einen isoelektrischen Punkt von 4,17 hat. Die Konzentration von Flo11A lag dabei zwischen 45 – 60 mg/mL.

Damit wurde einerseits sowohl ein erneutes Screening (*AmSO<sub>4</sub>*, *Anions*, *Classics*, *Classics Lite*, *Cryos*, *JCSG+*, *JCSG Core I*, *JCSG Core II*, *JCSG Core III*, *JCSG Core IV*, *MBC I*, *MBC II*, *PACT*), als auch die Reproduktion in der bekannten Kristallisationslösung vom *MBC II* Screen Nr. 43 versucht (Abbildung 20, Tabelle 30).



**Abbildung 20** Kristallisation von Flo11A ohne His-Tag. (A) Reproduktion in der Bedingung MBC II Nr. 43 durch *Microseeding* mit Flo11A-His<sub>6</sub>-Kristallen. (B) Nadel- bzw. Keimbildung in MBC II Nr. 69. (C) Transparente Cluster in MBC II Nr. 14. (D) Spontane Bildung eines einzigen Flo11A-Kristalls auf der Grundlage einer Optimierung, basierend auf den Bedingungen von (B) und (C) nach 14 Tagen.

**Tabelle 30** Zusammensetzung der Kristallisationsbedingungen für die Kristallisation von Flo11A.

Screen	<i>MBC II</i> Nr. 43	<i>MBC II</i> Nr. 69	<i>MBC II</i> Nr. 14	Optimierung
Bild	A	B	C	D
Salz	0,1 M MgCl <sub>2</sub>	0,1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Puffer	0,1 M HEPES; pH 7,5	0,1 M Na <sub>3</sub> Citrat, pH 5,6	0,1 M Tris, pH 8,5	0,1 M Na <sub>3</sub> Citrat, pH 6,0
Präzipitantz	30 % PEG 400	12 % PEG 4000	-	4 % PEG 4000
Methode	Hanging Drop	Sitting Drop	Sitting Drop	Sitting Drop
Volumen	2 µL	600 nL	600 nL	600 nL
Temperatur	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C
Zusätze	Microseeding	Nanopartikel	-	-
Cryo	+35 % PEG 400			+25 % Glycerin



In Tabelle 30 sind die verwendeten Puffer der Kristallisationslösungen aufgelistet. Da das Protein in einem Acetat/Essigsäurepuffer vorlag, ergab sich ein effektiver pH-Wert von 5,8 – 6,1 für die Bedingungen.

Eine spontane Kristallisation von Flo11A wurde zwar in den Bedingungen MBC II Nr. 43 und der Optimierung (Tabelle 30) erreicht, eine Reproduktion war aber nur durch *Microseeding* möglich. Dabei wurde entweder eine seeding-Lösung aus vorhandenen Flo11A-Kristallen hergestellt und Kristallnuklei daraus mithilfe eines Katzenschnurrhaares in eine frische Kristallisationslösung übertragen oder ein vorhandener Flo11A-Kristall wurde mit einem Katzenschnurrhaar direkt berührt und so Kristallnuklei in eine Kristallisationslösung übertragen (Abbildung 20).

Kristalle, die aus den Bedingung MBC II Nr. 43 und der Optimierung erhalten wurden, wurden in den jeweiligen Cryobedingungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Datensammlung am BESSY-II-Synchrotron durchgeführt.

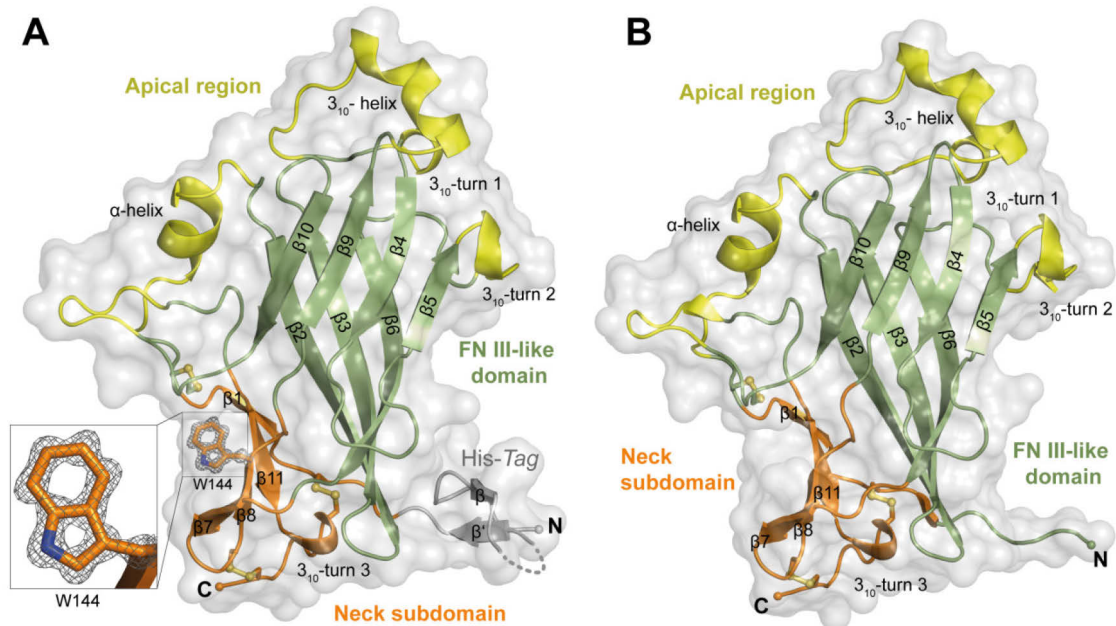
Initiale Phasen von Flo11-His<sub>6</sub> wurden von Dr. Maik Veelders durch eine Selenomethioninsubstitution und anschließende Phasierung durch *Multi-wavelength Anomalous Diffraction* (MAD) erhalten. Das Modell dieser Struktur ( $R_{\text{factor}}$ : 12,7 /  $R_{\text{free}}$ : 13,4) wurde in dieser Arbeit als Templat für die Strukturlösung durch Molekularen Ersatz (MR, *Molecular Replacement*) verwendet. Die Integration und Datenreduktion erfolgte mit *XDS* sowie *XSCALE*. Das Phasenproblem wurde mit *Phaser-MR* aus dem *Phenix*-Paket gelöst. Die Modellbildung wurde mit *AutoBuild* realisiert. Verfeinerungen wurden durch manuelle Inspektion mittels *Coot* und den Verfeinerungsprogrammen *phenix.refine* bzw. *REFMAC5* aus dem *CCP4*-Packet durchgeführt. Details zur Durchführung finden sich im Abschnitt 3.4 des Methoden-Teils. Die Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung sind in Tabelle 31 zusammengefasst. Für alle Strukturen wurden sehr hohe Auflösungen zwischen 0,89 und 1,05 Å erzielt. Flo11A-His<sub>6</sub> konnte lediglich in einer Kristallform ( $P2_12_12_1$ ) kristallisiert werden, während für Flo11A zwei Kristallformen gefunden werden konnten ( $P2_12_12_1$  und  $P2_12_12$ ).

**Tabelle 31** Statistiken zur Datensammlung, Prozessierung und Verfeinerung von Flo11A Kristallen.  
R.m.s.d. (root-mean-square deviation) von den idealen Bindungslängen und -winkeln.

Datensammlung & Prozessierung	S288CFlo11A-His <sub>6</sub> Kristallform I PDB ID code: 4UYR	S288CFlo11A Kristallform I PDB ID code: 4UYT	S288CFlo11A Kristallform II PDB ID code: 4UYS
X-ray Quelle	ID29, ESRF, Grenoble, France	MX-14-1, BESSY II, Berlin, Germany	MX-14-1, BESSY II, Berlin, Germany
Detektor	Pilatus 6M	Pilatus 6M	Pilatus 6M
Wellenlänge (Å)	0,70847	0,91841	0,79991
Raumgruppe	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Zellmaße ( <i>a,b,c</i> Å)	30,45, 54,83, 121,9	30,37, 54,74, 121,4	33,93, 52,68, 101,7
Auflösung (Å)	40,8 – 0,89 (0,94 – 0,89)	40,5-1,03 (1,09-1,03)	28,5-1,05 (1,11-1,05)
Gesamtreflektionen	789616	375185	494264
Multiplizität	5,1 (4,9)	3,8 (2,6)	5,8 (5,3)
Einzigartige Reflexe	156350	98507	85769
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	5,9 (77,9)	3,4 (38,0)	6,0 (62,1)
Vollständigkeit (%)	99,7 (99,6)	98,5 (93,6)	100,0 (99,9)
<i>I</i> / <i>σ</i> ( <i>I</i> )	13,1 (2,0)	18,7 (2,6)	11,4 (2,5)
Mosaizität (°)	0,115	0,144	0,221
Wilson B-Factor (Å <sup>2</sup> )	8,005	7,9	8,4
<b>Verfeinerung</b>			
Auflösung (Å)	40,8 – 0,89	40,5-1,03	28,5-1,05
<i>R</i> <sub>factor</sub> , <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	12,7, 13,4	12,9, 14,4	14,7, 17,0
Reflektionen (working, test set)	151392, 10997	97267, 6434	84603, 6166
Vollständigkeit (%)	99,3	98,3	99,9
r.m.s.d. :			
Bindungslängen (Å)	0,011	0,011	0,011
Bindungswinkel (°)	1,760	1,451	1,593
Anzahl Atome	1851	1795	1760
Mittlerer <i>B</i> Wert (Å <sup>2</sup> )	15,7	14,8	12,7

### 4.2.3 Die Struktur von Flo11A-His<sub>6</sub> und Flo11A

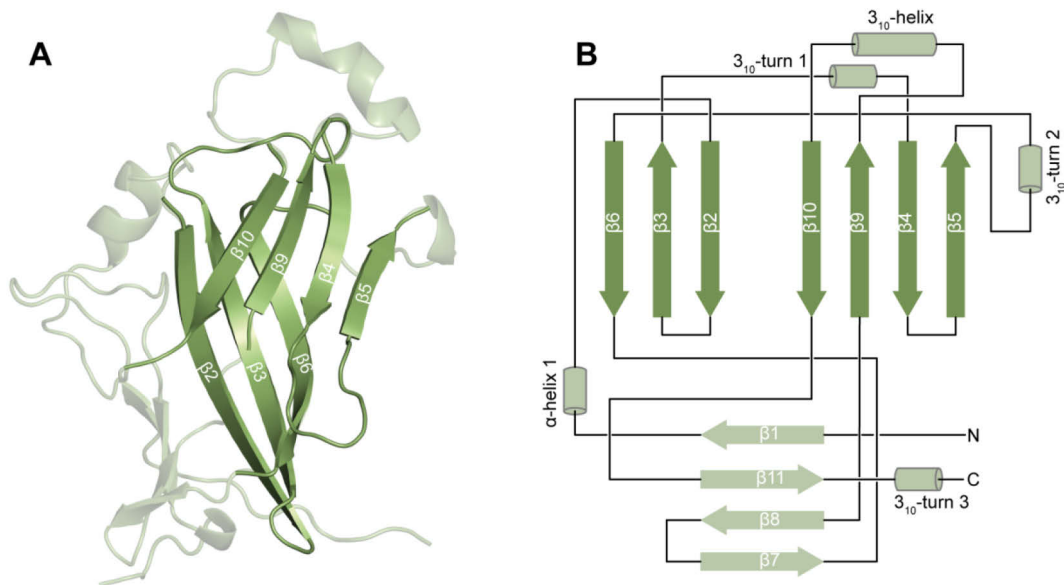
Die Kristallstruktur von ScFlo11A mit und ohne His<sub>6</sub>-Tag ist in Abbildung 21 dargestellt. Sie zeigt eine globuläre, keilförmige Domäne mit einem komplexen Faltungsmotiv, das sich aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammensetzt (Abbildung 21).



**Abbildung 21** Struktur der Flo11A Domäne aus *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Kristallstruktur von Flo11A-His<sub>6</sub>. Die Fibronektin-Typ III Domäne (FN3) ist in grün dargestellt, die Neck subdomain in orange, die Apical region in Gelb und der His<sub>6</sub>-Tag in grau. Die atomare Auflösung von 0.89 Å ist exemplarisch an dem Rest W144 gezeigt mit der korrespondierenden  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Elektronendichte (Konturierung bei  $1\sigma$ ) (PDB code: 4UYR). (B) Kristallstruktur von Flo11A. Die Beschriftungen sind analog zu (A) (PDB code: 4UYS).

Das  $\beta$ -Faltblatt I besteht aus den  $\beta$ -Strängen 2, 3 und 6;  $\beta$ -Faltblatt II aus den  $\beta$ -Strängen 4, 5, 9 und 10 und  $\beta$ -Faltblatt III aus den  $\beta$ -Strängen 1, 7, 8 und 11. Eine kurze  $\alpha$ -Helix befindet sich zwischen  $\beta$ -Faltblatt I und III, während eine  $3_{10}$ -Helix auf der gegenüberliegenden Seite der Termini  $\beta_9$  mit  $\beta_{10}$  von  $\beta$ -Faltblatt II verbindet. Die Faltblätter I und II bilden ein  $\beta$ -Sandwich als Kerndomäne, während das  $\beta$ -Faltblatt III eine einzigartige Neck-like Subdomäne bildet. Diese bildet den Übergang zur B-Domäne. Hier werden zudem die beiden Termini durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert, C37-C201 und C141-C205. Eine dritte Disulfidbrücke, C44-C179, fixiert die Verbindung zwischen der Neck-like Subdomäne und der Kernstruktur von ScFlo11A.

Die Kernstruktur der Flo11A Domäne, bestehend aus den Faltblättern I und II, zeigt ein  $\beta$ -Sandwich-Faltungsmotiv, welches kennzeichnend für die Flo11 Familie ist (Abbildung 22).



**Abbildung 22** Topologie der Kernstruktur von Flo11A. (A) Kristallstruktur von Flo11A mit hervorgehobenem  $\beta$ -Sandwich. (B) Topologie von Flo11A. Die Nummerierung der Sekundärstrukturelemente wurde vom N- zum C-Terminus vorgenommen.

Um diese Kernstruktur näher zu charakterisieren, wurden das Archiv der *PDB*- bzw. *SCOP*-Datenbank nach strukturellen/topologischen Ähnlichkeiten mit Hilfe des Servers *PBDeFold* durchsucht. Dies führte zunächst zu keinem eindeutigen Ergebnis, wobei die größte Übereinstimmung zu der Immunoglobulin-Superfamilie (Ig) gezeigt wurde. Die Ig-Superfamilie kann weiter unterteilt werden in einen s-, h-, c- und v-Subtyp. Durch einen Vergleich mit diesen Subtypen zeigte sich, dass das  $\beta$ -Sandwich von Flo11A die Topologie des s-Subtyps aufweist. Diese Topologie des s-Subtyps entspricht der Klasse von Fibronectin Typ III Domänen (FN3) (Abbildung 23). Diese besteht aus einem siebensträngigen  $\beta$ -Sandwich, der sich aus einem 3-strängigen und einem 4-strängigem  $\beta$ -Faltblatt zusammensetzt und die Verknüpfung der FN3/Flo11A-Topologie aufweist (Abbildung 23A, C). Die FN3 Domäne bildet eine große Familie innerhalb der Immunoglobulin (Ig) Superfamilie, welche Adhäsine, Zelloberflächenhormone und Cytokinrezeptoren, Chaperone und Kohlenhydrat-Bindedomänen beinhaltet<sup>206</sup>. Die FN3 Domäne unterscheidet sich von anderen Ig Domänen durch den vierten  $\beta$ -Strang, C', welcher Teil des zweiten, aber nicht des ersten  $\beta$ -Faltblatts ist (Abbildung 23C).

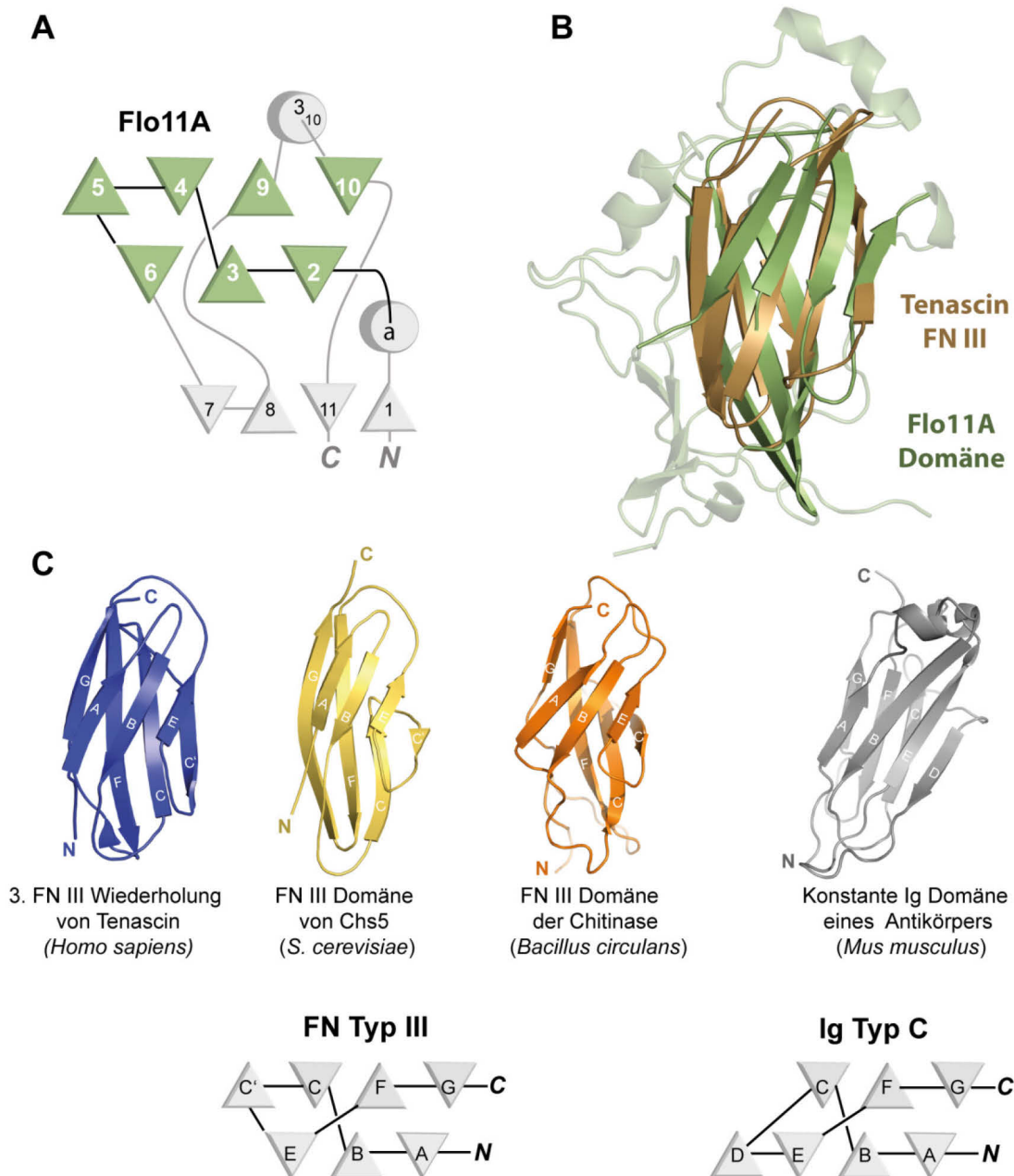


Abbildung 23 Flo11A im Vergleich mit der FN3 Domäne. (A) Topologie der Kernstruktur der Flo11A Domäne. (B) Strukturelles Alignment der  $\beta$ -Sandwich-Domäne von Flo11A (grün) und der FN3 Domäne von Tenascin (braun) (PDB code: 1TEN). (C) Weitere FN3 Domänen im Vergleich mit einer Ig Domäne eines Antikörpers, welche eine Ig Typ C Topologie aufweist.

#### 4.2.4 Eigenschaften der Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae* S288C

Die ScFlo11A Domäne unterscheidet sich auf den ersten Blick von anderen A-Domänen der Glykan-bindenden Flokkuline, wie z.B. ScFlo5A, durch das Fehlen einer konkavförmigen Bindetasche für kleinere Liganden. Stattdessen zeigt die Kristallstruktur einen hohen Grad an Solvenz-exponierten aromati-

schen Resten, nämlich sechs von insgesamt sieben Tryptophanen und 8 von insgesamt 11 Tyrosinen in der Struktur (Abbildung 24).

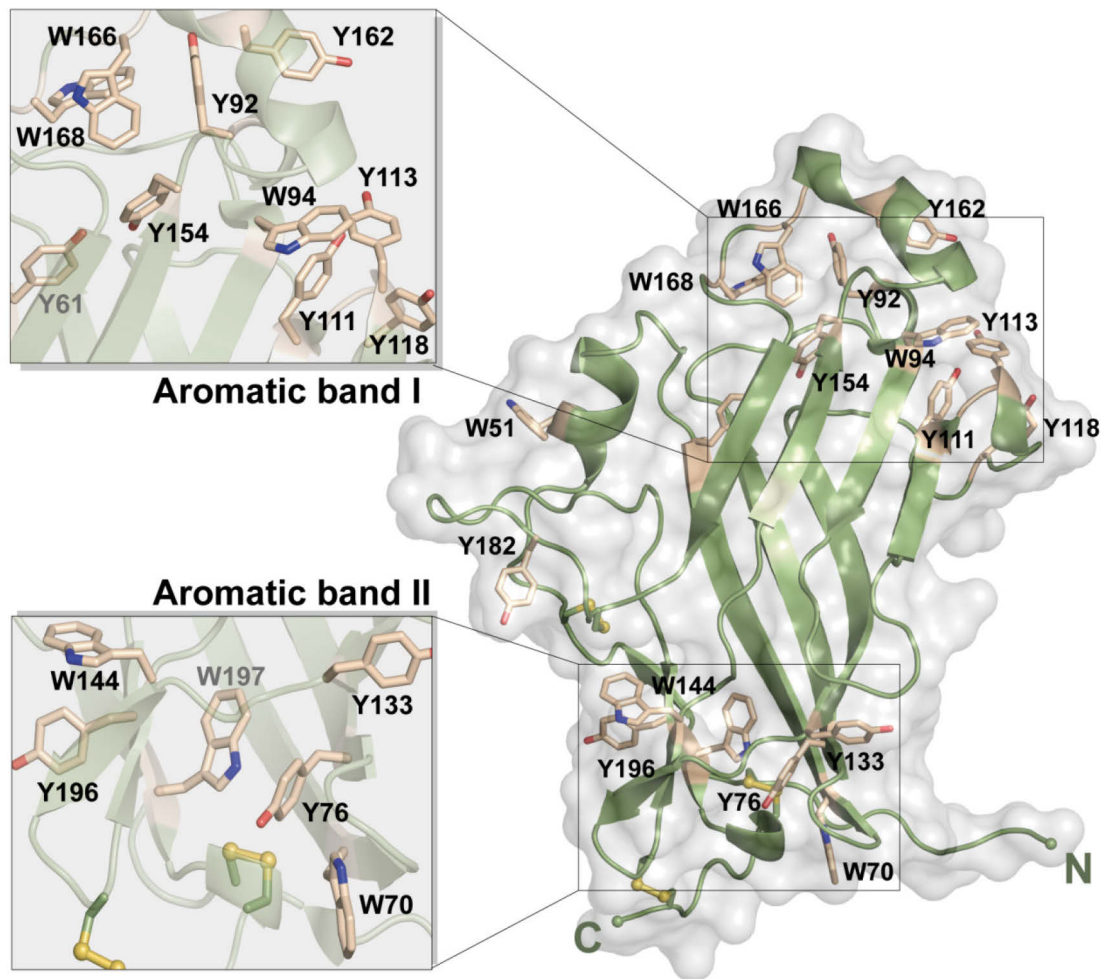
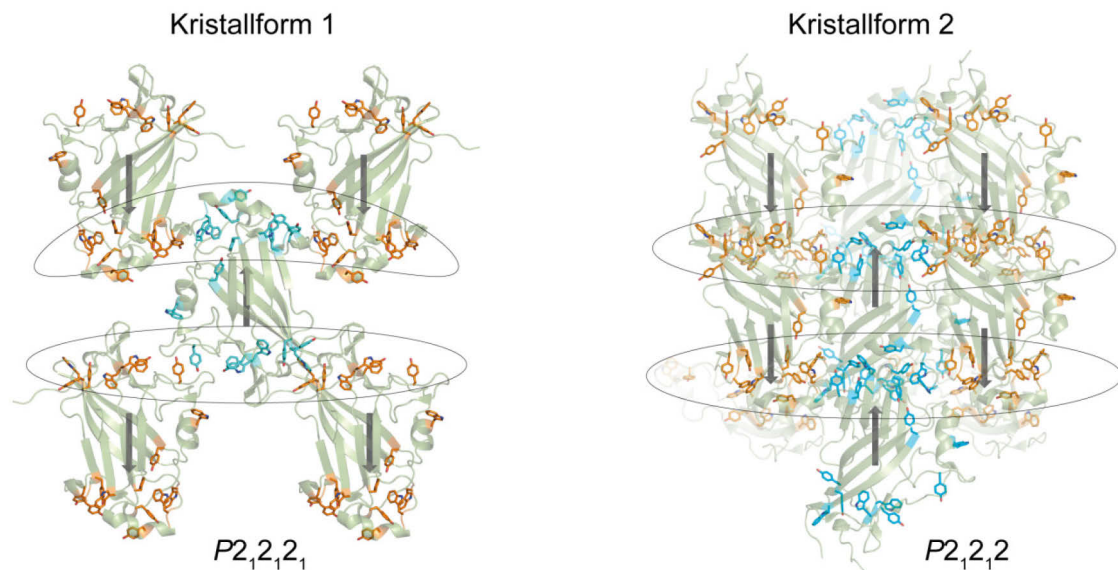


Abbildung 24 Kristallstruktur von ScFlo11A mit solvens-exponierten aromatischen Resten. (A) Die aromatischen Reste sind in zwei Bändern (*Aromatic bands*) angeordnet. Y61 und W197 sind in grau dargestellt, da sie weniger exponiert sind.

Diese aromatischen Reste sind in zwei Bändern (*Aromatic band I and II*) jeweils am oberen und unteren Ende der Domäne angeordnet. Das kleinere *Aromatic band I* befindet sich nahe der Termini und der *Neck subdomain*, während sich *band I* auf der gegenüberliegenden Seite befindet und einen Großteil der *Apical region* ausmacht. In der Kristallpackung zeigt sich, dass *Aromatic band I* jeweils mit *Aromatic band I* einer Symmetrieverwandten Domäne interagiert (Abbildung 25). Für die Kristallstruktur ohne His<sub>6</sub>-Tag konnte zusätzlich zu der Kristallform 1 eine zweite Kristallform gefunden werden (Kristallform 2) (Abbildung 25). Auch dort beruhen die Kristallkontakte auf den aromatischen Resten.

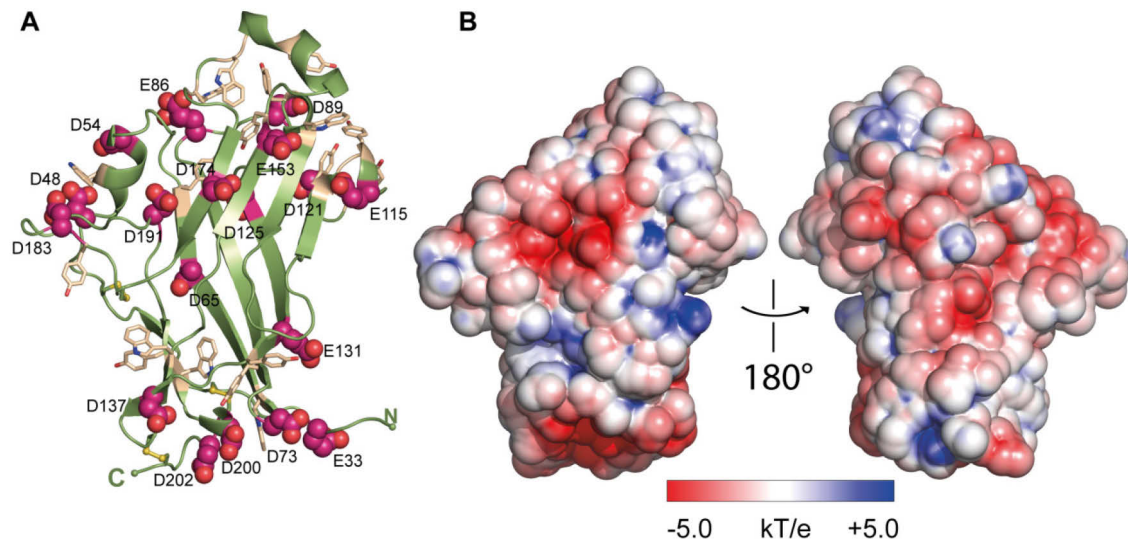




**Abbildung 25** Rekonstruktion der ScFlo11A Interaktionen der Kristallpackungen aus zwei verschiedenen Kristallformen. Die hervorgehobenen geclusterten aromatischen Reste von Band I interagieren über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander. Die Pfeile zeigen die Orientierung von der *Neck domain* zur hydrophoben *Apical region*. ScFlo11A-His6 und ScFlo11A konnten in der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  kristallisiert werden, während die Raumgruppe  $P2_12_12$  nur für ScFlo11A erhalten werden konnte.

Trotz unterschiedlicher Kristallpackungen zeigt die ScFlo11A Domäne ein konserviertes *Clustern* der aromatischen Bänder, wenn auch mit unterschiedlichen relativen Anordnungen der Bänder I und II.

Die Bänder der aromatischen Reste sind umgeben von sauren Resten, hauptsächlich Glutamat und Aspartat. Dies erklärt auch den relativ sauren pI der ScFlo11A Domäne von 4,17. Diese Verteilung der sauren Reste ist in Abbildung 26 dargestellt. Die elektrostatische Oberflächenverteilung zeigt die sauren Charakteristika der Oberfläche der Flo11A Domäne.



**Abbildung 26** Oberflächeneigenschaften der Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae* S288C. (A) Kristallstruktur der ScFlo11A Domäne mit aromatischen Resten (Trp und Tyr) als *Sticks* und sauren Resten (Glu und Asp) als *Spheres*. (B) Analyse des elektrostatischen Oberflächenpotentials zeigt die sauren Charakteristika der Oberfläche von ScFlo11A. Die Analyse wurde mit APBS durchgeführt<sup>191</sup>.

Das auffällige Clustern der aromatischen Reste zusammen mit den sauren Resten führte zu der Frage, ob diese Reste innerhalb der Flo11A Familie konserviert vorliegen. Dazu wurde ein multiples Sequenzalignment (MSA) durchgeführt. Um die funktionelle Rolle der aromatischen und sauren Reste zu charakterisieren, wurden Sequenzen gewählt, deren paarweise Sequenzidentität unter 50 % liegt. Das MSA ist in Abbildung 27 dargestellt und zeigt, dass die Reste, welche die aromatischen/sauren Bänder formen, konserviert sind, was auf eine funktionelle Rolle innerhalb der Flo11A Domäne spricht. Desweiteren sind die in der *Neck subdomain* und in der *Apical region* lokalisierten Disulfidbrückenbildenden Cysteine weitgehend konserviert.



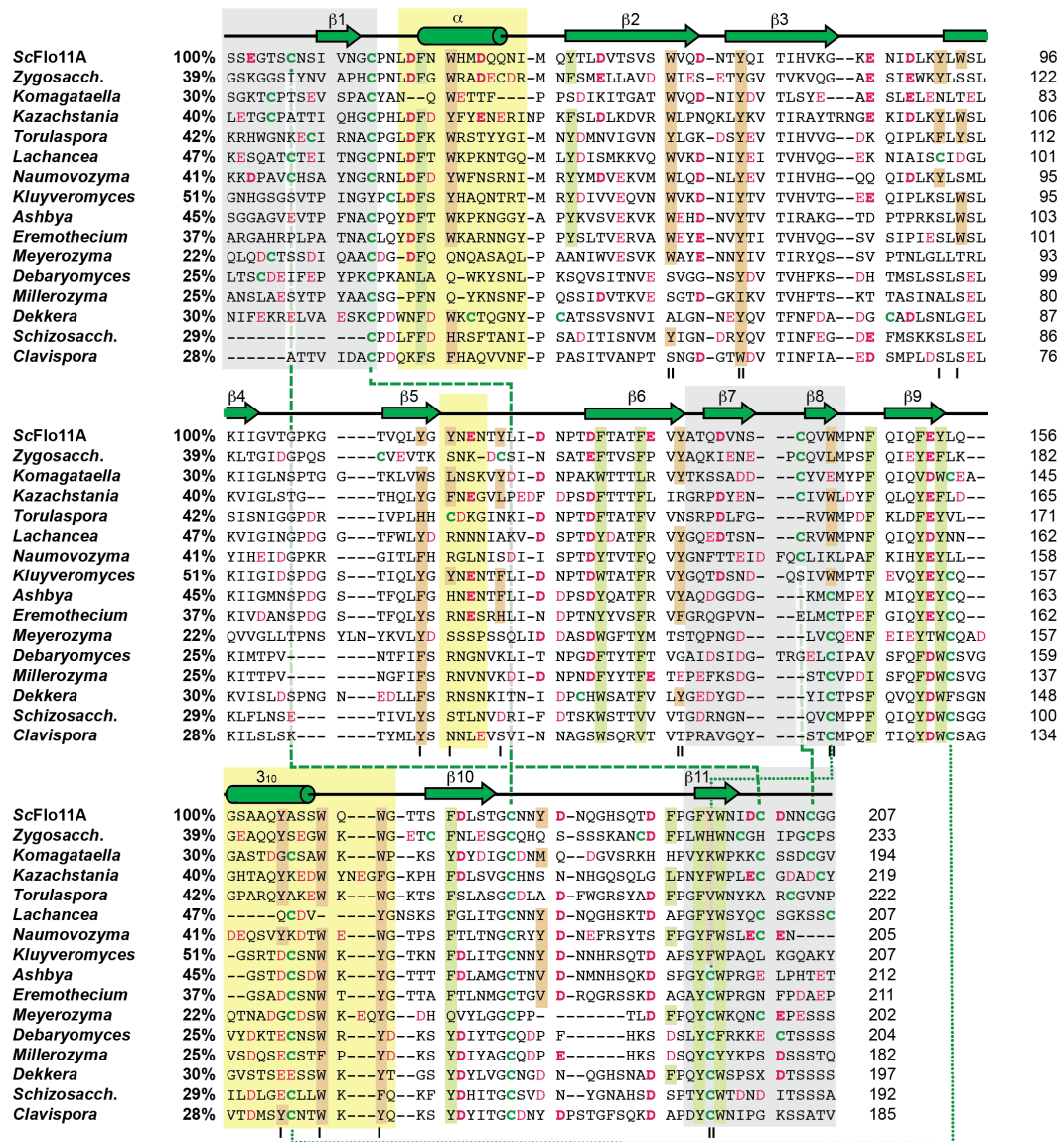
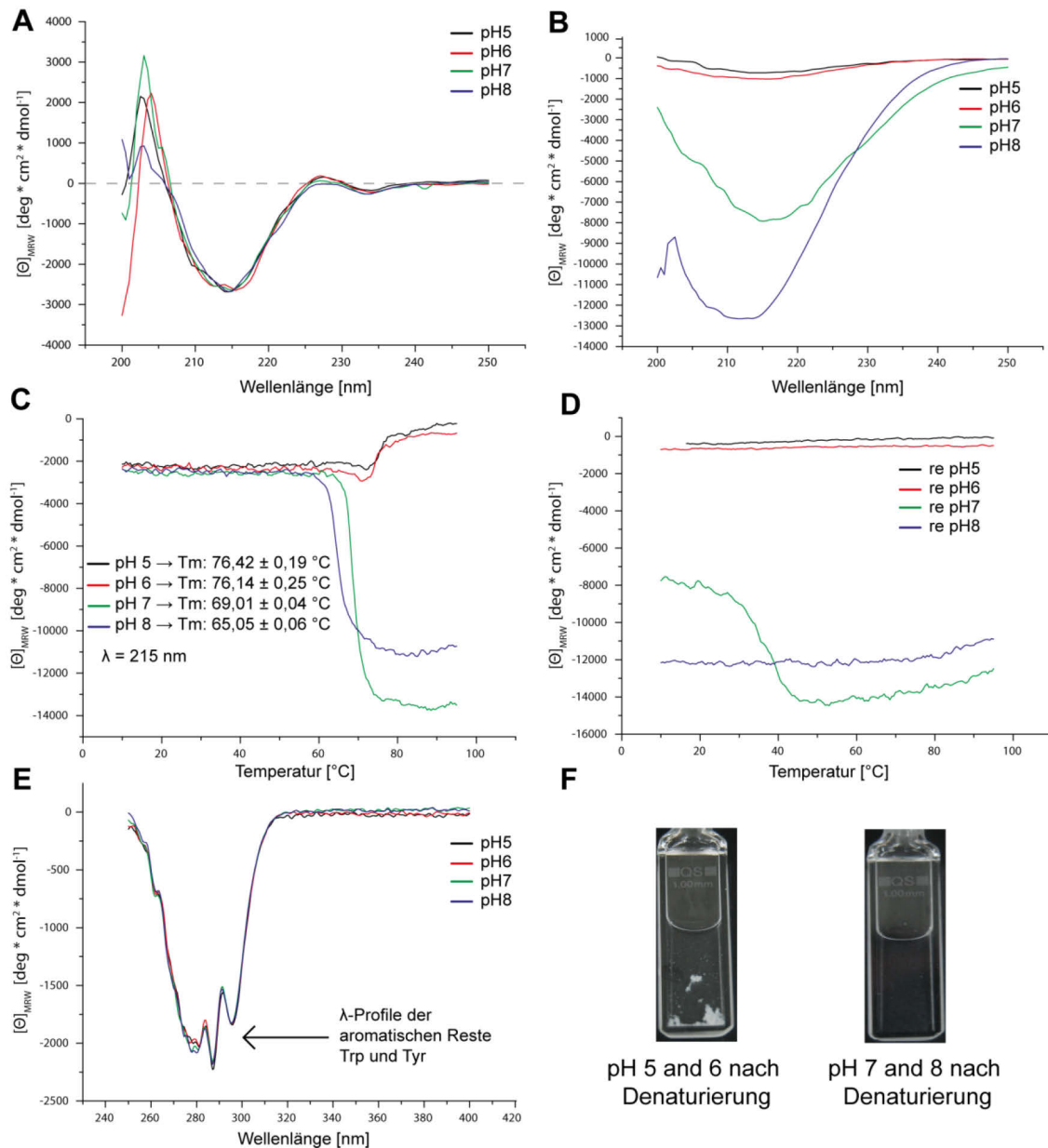


Abbildung 27 Multiples Sequenzalignment (MSA) von Mitgliedern der Flo11A Proteinfamilie. Die Sequenzen stammen aus einer *blastp* Suche mit der Sequenz der ScFlo11A als Eingabesequenz gegen das Taxon der Ascomykota (Taxid: 4890). Die Sequenzen wurden mittels Clustal Omega<sup>207</sup> aligniert. Die Sequenzidentitäten sind in Prozent hinter den Gattungsnamen angegeben. Die Sekundärstrukturelemente sind der Kristallstruktur von ScFlo11A entnommen. Die Sequenzen stammen von UniProt (von oben nach unten): NP\_012284.3; CDH12265.1; XP\_002491941.1; CCK71310.1; XP\_003680146.1; XP\_002551486.1; XP\_003676437.1; XP\_453068.1; AGO12335.1; XP\_003645269.1; EDK40758.2; XP\_457064.2; XP\_004194602.1; EIF49527.1; EPY53046.1; und XP\_002614456. Die relevanten aromatischen und sauren Reste sind hervorgehoben, während die an Disulfidbrücken beteiligten Cysteine durch gestrichelte Linien miteinander verbunden sind. Ein alternatives Disulfidbrückenmuster tritt bei einer Subfamilie der Flo11A Domänen auf und ist als gepunktete Linie dargestellt. Die römischen Ziffern verweisen auf die Aromatischen Bänder I und II. Der grau hinterlegte Kasten zeigt die Neck subdomain, während der gelbe Kasten die Apical region zeigt.

#### 4.2.5 CD-Spektroskopie von Flo11A aus *S. cerevisiae* S288C

Um die Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae* S288C näher zu charakterisieren, wurde das aufgereinigte Protein mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die Fern-UV CD-Spektren zeigen, dass die Struktur hauptsächlich aus  $\beta$ -Strukturelementen aufgebaut ist und diese unabhängig vom verwendeten pH-Wert sind (Abbildung 28A). Der hohe Anteil an  $\beta$ -Strukturelementen wurde auch durch die Kristallstruktur bestätigt. Die Schmelzpunktanalyse zeigt jedoch, dass ScFlo11A zwischen pH 5 und 6 den höchsten Schmelzpunkt mit knapp 76 °C aufweist (Abbildung 28C). Dies ist insofern interessant, da der isoelektrische Punkt ebenfalls bei 5,2 liegt. Fernab des pI, bei pH 7 und 8, ist der Schmelzpunkt mit 69 bzw. 65 °C signifikant niedriger. Die Anwesenheit von drei Disulfidbrücken dürfte ebenfalls die Stabilität und damit den Schmelzpunkt erhöhen. Eine Rückfaltung nach Hitzedenaturierung konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 28D). Dabei zeigte sich, dass das Protein bei pH 5 und 6 präzipitiert, während es bei pH 7 und 8 in Lösung verbleibt (Abbildung 28F). Das Fern UV CD-Spektrum nach Denaturierung zeigt, dass eventuell andere Sekundärstrukturelemente ausgebildet werden können. Ein solcher Intermediatzustand zwischen der nativen und ungefalteten Struktur wird auch als *molten globule state* bezeichnet. Dieses Phänomen wurde erstmalig von A. Wada and M. Ohgushi 1983 beschrieben<sup>208</sup>. Diese Stadien von teilweise gefaltetem Protein werden oft unter mild-denaturierenden Bedingungen wie z.B. niedrigem pH-Wert oder hoher Temperatur angetroffen<sup>209</sup>. Dies trifft möglicherweise auch auf ScFlo11A zu.

Das Nah-UV CD-Spektrum zeigt die typischen Absorptionsmuster der aromatischen Aminosäuren (Abbildung 28E). Die Minima zwischen 290 und 300 nm entsprechen dem Absorptionsmaximum von Tryptophan, während das Minimum zwischen 280 und 290 der Aminosäure Tyrosin zugerechnet werden kann.



**Abbildung 28** CD-Spektroskopie der Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae* S288C. (A) Fern-UV CD-Spektren bei verschiedenen pH-Werten. Der pH scheint keinen Einfluss auf die Sekundärstrukturelemente zu haben. Das Spektrum zeigt, dass die Flo11A Domäne hauptsächlich aus  $\beta$ -Strukturelementen besteht. (B) Fern-UV CD-Spektrum von ScFlo11A nach Hitzedenaturierung. Die native Struktur wird nicht wieder erreicht. (C) Schmelzpunktanalyse ( $T_m$ , melting temperature) von ScFlo11A bei verschiedenen pH-Werten, aufgenommen bei  $\lambda = 215$  nm. (D) Rückläufiger Temperaturscan nach Hitzedenaturierung. (E) Nah-UV CD-Spektrum von ScFlo11A bei verschiedenen pH-Werten. Die  $\lambda$ -Profile verweisen auf die Existenz der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin. (F) Abbildung von denaturiertem ScFlo11A nach Hitzedenaturierung bei verschiedenen pH-Werten. Die Präzipitation bei pH 5 und 6 kommt wahrscheinlich durch den isoelektrischen Punkt der Flo11A Domäne von 5,2 zustande. Bei pH 7 und 8 ist die Lösung nach Denaturierung klar.

#### 4.2.6 Kälte-induzierte Aggregation der Flo11A Domäne

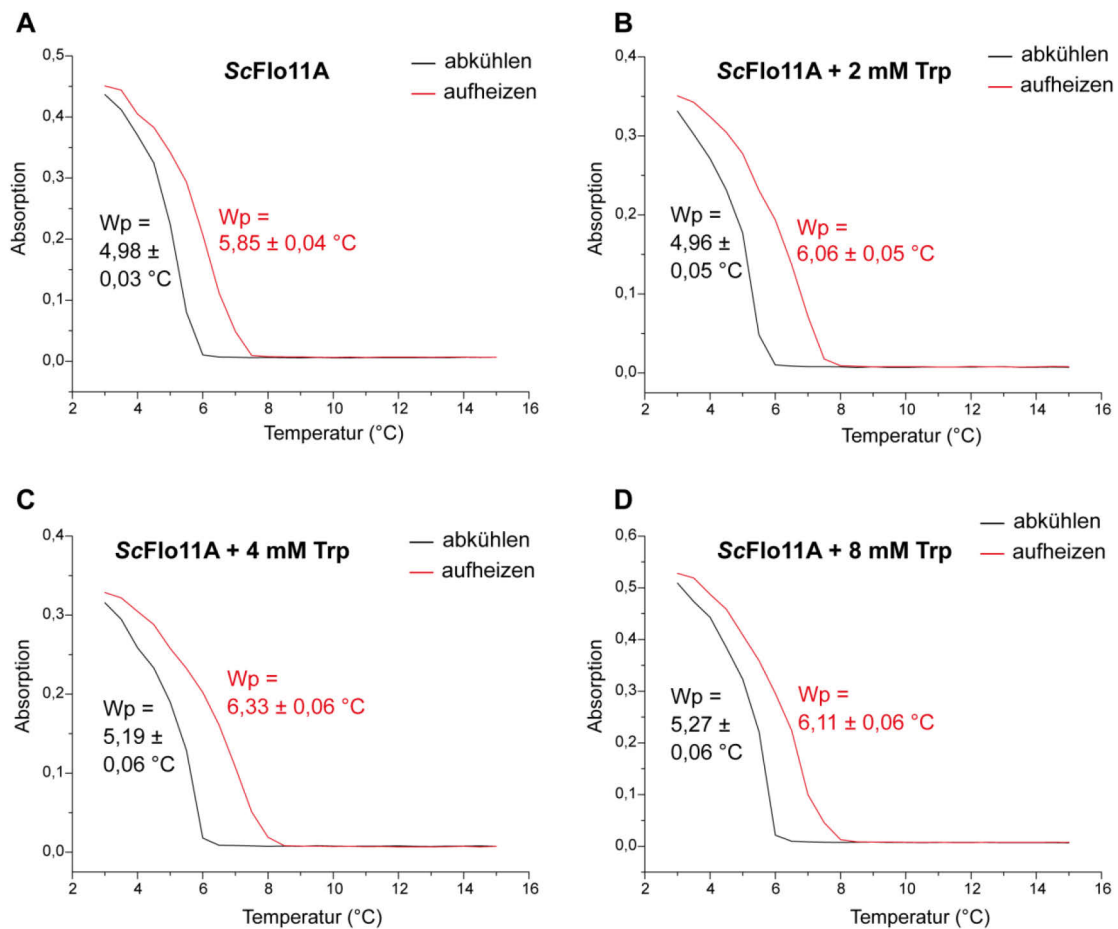
Die Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae* S288C besitzt in Tris-Puffer (pH 8) eine sehr hohe Löslichkeit von über 80 mg/mL. Um die hohe Löslichkeit für die Kristallisation zu reduzieren, wurde das Protein in Acetat/Essigsäure Puffer pH 5,5 umgepuffert (pI ScFlo11A 5,23). In diesem Puffer zeigte sich bei Konzentrationen von mehr als 20 mg/mL, dass das Protein auf Eis ein reversibles, gelartiges Aggregat bildet (Abbildung 29). Dieses Gel/Aggregat zeichnete sich durch eine deutlich höhere Viskosität als die Proteinlösung aus. Wurde das Gel/Aggregat wieder auf Raumtemperatur gebracht, ging das Protein in Lösung über. Dieser Vorgang konnte mehrfach wiederholt werden.



**Abbildung 29** Kälteaggregation von ScFlo11A in Essigsäure/Acetatpuffer pH 5,2 bei verschiedenen Temperaturen.

Um dieses kälteabhängige Verhalten näher zu charakterisieren, wurde versucht, den Umschlag zur Aggregation zu bestimmen. Dazu wurde die Proteinlösung von 20 mg/ml in 20 mM Essigsäure/Acetatpuffer mit Hilfe eines kühlbaren Spektrometers untersucht (Abbildung 30). Der Wendepunkt für die Gelbildung der ScFlo11A Lösung lag dabei bei etwa 5 °C, während die Rückbildung zur Proteinlösung bei 5,6 °C erfolgte. Da das Phänomen der Kälteaggregation noch nicht vollständig verstanden ist, wurde in einem zweiten Schritt versucht, diesen Prozess zu beeinflussen oder zu inhibieren. In der Kristallstruktur von Flo11A zeigte sich, dass Kristallkontakte in beiden Kristallformen hauptsächlich durch oberflächen-exponierte aromatische Reste (Tryptophan und Tyrosin) verursacht wurden. Daher wurde versucht, durch die Zugabe von Tryptophan den Prozess der Gel/Aggregat-Bildung zu inhibieren oder zu beeinflussen. Die ScFlo11A

Lösung wurde mit Tryptophan in Konzentrationen von 2 bis 8 mM versetzt, so dass ein Überschuss an Tryptophan gewährleistet wurde. Die Gel/Aggregatbildung konnte nicht inhibiert werden. Es zeigte sich jedoch eine leichte Verschiebung des Wendepunktes bei der Gel/Aggregatbildung bei Zugabe von 4 bzw. 8 mM Tryptophan. Der Unterschied ist allerdings zu gering um einen Effekt von Tryptophan auf die Gel/Aggregatbildung bestätigen oder widerlegen zu können.



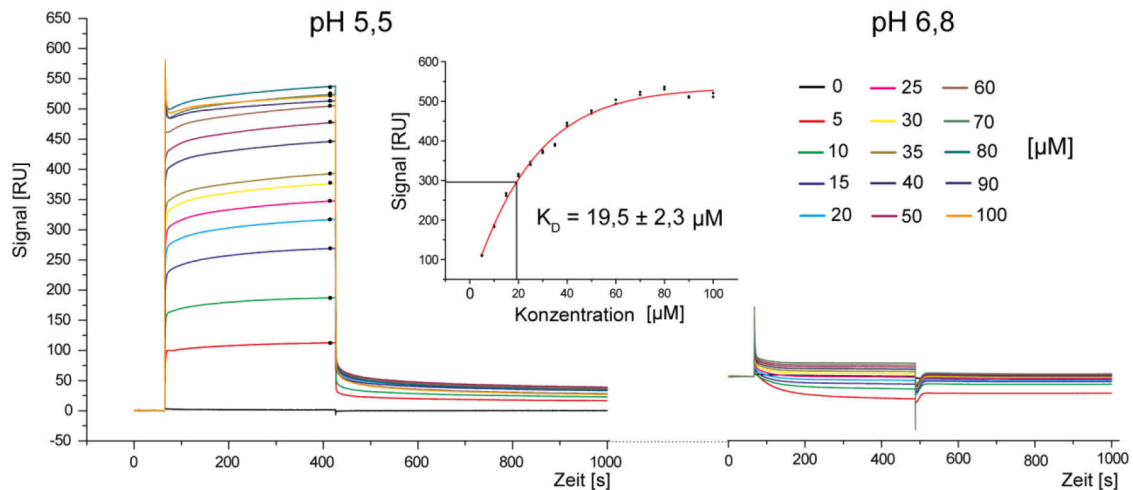
**Abbildung 30 Wendepunktbestimmung der kälteabhängigen Aggregation von ScFlo11A.** (A) ScFlo11A. (B) ScFlo11A versetzt mit 2 mM L-Tryptophan. (C) ScFlo11A versetzt mit 4 mM L-Tryptophan. (D) ScFlo11A versetzt mit 8 mM L-Tryptophan. Die Konzentration von ScFlo11A betrug 20 mg/mL in 20 mM Essigsäure/Acetat-Puffer. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm aufgenommen. Die Temperaturänderung erfolgte mit 0,5 °C/min von 15 bis 3 °C. Die Wendepunkte wurden durch einen sigmoidalen Fit ermittelt.

#### 4.2.7 Homophile ScFlo11A-ScFlo11A Interaktionen

Frühere Studien deuteten auf eine homophile Interaktion der Flo11A Domäne hin<sup>210</sup>. Dies sollte in dieser Arbeit mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) überprüft und quantifiziert werden. ScFlo11A wurde als Ligand dazu kovalent über terminale Amine (N-Terminus und  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysin) auf einem CM5 Chip immobilisiert. Die Analyt-Lösung bestand ebenfalls aus ScFlo11A und wurde in der Flusszelle über den immobilisierten Liganden geschickt.

Dabei fließt die Analytlösung sowohl über eine Referenzzelle, wo kein Ligand immobilisiert wurde, als auch über die Flusszelle, wo ScFlo11A immobilisiert wurde. Diese Referenzzelle wird stets als Kontrolle von allen Messungen abgezogen, sodass nur eine Flo11A-Flo11A Interaktion berücksichtigt wird, nicht aber eine mögliche Interaktion mit der Dextranoberfläche des CM5 Chips. Eine Interaktion resultiert in der Veränderung der Brechungsindizes auf der Chipoberfläche, was in einer Änderung des Resonanzwinkels  $\theta$  gemessen wird.

Eine konzentrationsabhängige ScFlo11A-ScFlo11A Interaktion konnte so nachgewiesen werden (Abbildung 31). Diese Interaktion ist allerdings stark pH-abhängig, wie sich aus einem Vergleich zwischen pH 5,5 und 6,8 ergibt. Nur bei einem pH von 5,5 lässt sich eine effiziente Flo11A-Flo11A Interaktion beobachten, während bei einem pH von 6,8 bereits keine Interaktion mehr festgestellt werden kann. Ein hierbei detektiertes negatives Signal deutet darauf hin, dass die Flo11A Moleküle eine größere Interaktion mit der Referenzzelle zeigen als mit der Flo11A-immobilisierten Flusszelle. Für die Flo11A-Flo11A Interaktion bei pH 5,5 konnte eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von  $19,5 \pm 2,3 \mu\text{M}$  ermittelt werden.



**Abbildung 31** ScFlo11A-ScFlo11A Interaktionen bei pH 5,5 und 6,8 mittels Oberflächenplasmonresonanz (Biacore). Die Sensorgramme zeigen die Flo11A-Flo11A Interaktion mit Konzentrationen von 5 bis 100 µM ScFlo11A in Lösung. ScFlo11A wurde auf einen CM5 Chip mit 5.000 RU (Resonance Units) immobilisiert. Die Analyse wurde in Acetatpuffer pH 5,5 durchgeführt, was nahe am pI von ScFlo11A liegt (links). Höhere pH-Werte resultierten in sehr schwacher Wechselwirkung (rechts). Der Einschub zeigt die konzentrationsabhängige Veränderung in Plasmonresonanzsignalen (Punkte), welche mit einem 1:1 Gleichgewichts-Bindungsmodells *gefittet* werden konnten.

In früheren Studien, welche hauptsächlich auf klassischer Genetik beruhen, wurde für die Flo11-vermittelte Adhäsion postuliert, dass sie auf hydrophoben Interaktionen beruhen<sup>57, 211</sup>. Die Expression von *FLO11* geht außerdem mit einer Erhöhung der Hydrophobizität der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* einher<sup>107</sup>. Die Kristallstruktur von ScFlo11A zeigte Oberflächen-exponierte aromatische Reste, welche innerhalb der Kristallpackung an Interaktionen beteiligt sind. Ein Großteil dieser Reste ist innerhalb der Flo11 Familie hochkonserviert.

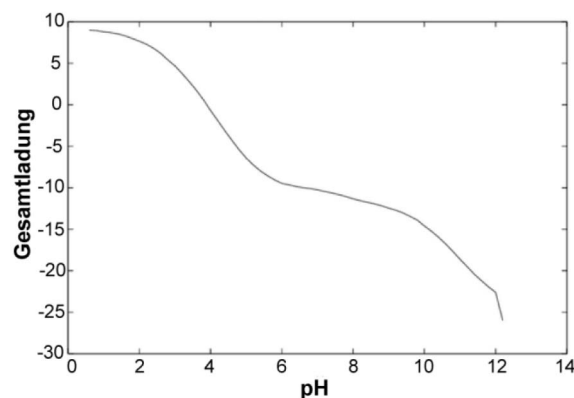
Eine Interaktion bei pH 5,5, nahe des pI von ScFlo11A, lässt vermuten, dass die Interaktion über die aromatischen Reste Tryptophan und Tyrosin erfolgt. Unter diesen Bedingungen zeigt die Flo11A Domäne keine Nettoladung, sodass eine Interaktion über die aromatischen Reste ermöglicht wird. Diese aromatischen Reste sind umgeben von den sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat, die erst bei einem höheren pH als dem isoelektrischen Punkt eine negative Ladung tragen. Bei einem pH von 6,8 trägt ScFlo11A eine Gesamtladung von -6,8 (Tabelle 32, Abbildung 32). Treffen zwei Flo11A Domänen mit einer derartig negativen Ladung aufeinander, ist die Abstoßung größer als die Interaktion über die aromatischen Reste, sodass keine Bindung ermöglicht werden kann. Dies



würde auch die negativ detektierten Signale der Flo11A-Flo11A Interaktion bei pH 6,8 erklären.

**Tabelle 32 Oberflächenladung von ScFlo11A-His<sub>6</sub> bei verschiedenen pH-Werten. Die Berechnung beruht auf den pKs Werten der isolierten Reste. Für ein gefaltetes Protein können diese Werte abweichen.**

pH	4,4	4,8	5,2	5,5	6,4	6,8	7,6	8,4	9,2	9,6
Ladung	9,0	4,9	2,0	0,2	-4,3	-6,8	-10,3	-13,7	-18,3	-21,4

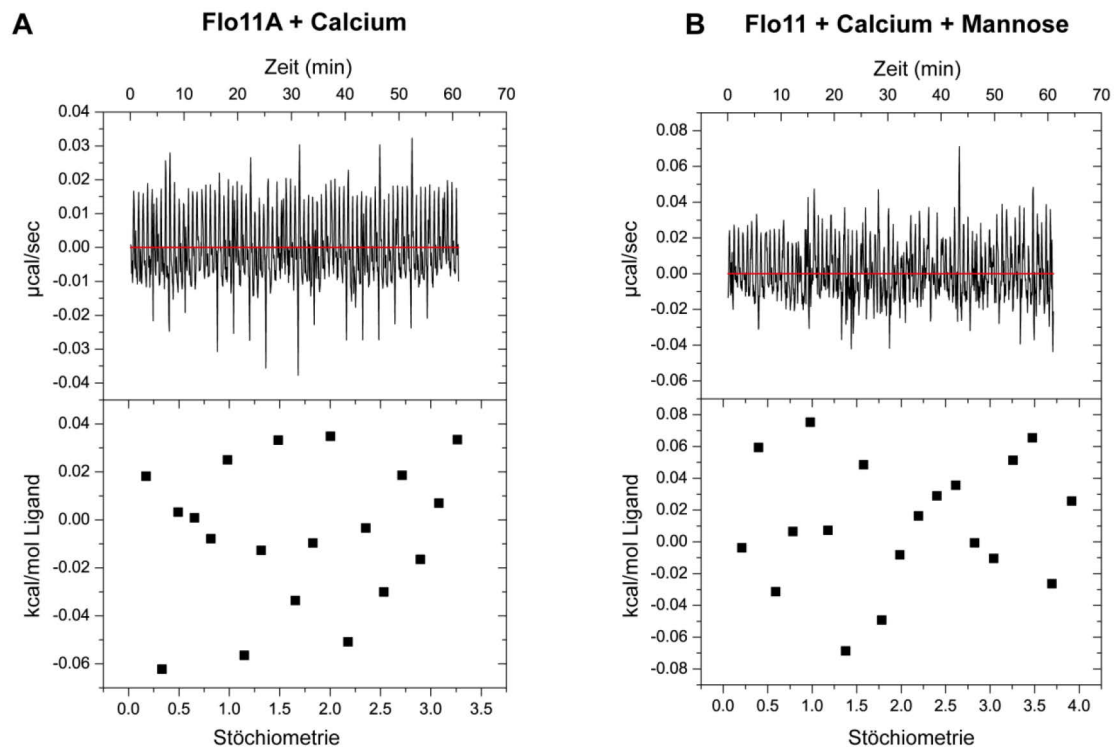


**Abbildung 32 Theoretische Titrationskurve von ScFlo11A (ohne His-Tag, PDB: 4UYT). Die Kurve wurde berechnet mit dem H++ Server<sup>212</sup> unter den Standardeinstellungen: Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  ( $\epsilon_{\text{extern}} = 80$ ;  $\epsilon_{\text{intern}} = 10$ ); Ionenstärke 0,15 M, pH 4,0.**

Die Flo11A vermittelte Interaktion scheint damit nicht, wie bei den anderen Flokkulinen Flo1, Flo5 oder Flo9, Glykanabhängig zu sein. Dennoch gab es Studien, die für Flo11 eine  $\text{Ca}^{2+}$ - und Mannose-Abhängigkeit darlegten<sup>77</sup>. Diese Experimente bezogen sich allerdings auf *in vivo* Experimente, in denen *FLO11*-exprimierenden Hefezellen verwendet wurden. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden Bindungsstudien mit aufgereinigtem ScFlo11A und D(+)-Mannose bzw.  $\text{Ca}^{2+}$  als Ligand durchgeführt. Dazu wurde isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt und ScFlo11A in einer Konzentration von 315  $\mu\text{M}$  (in Acetatpuffer pH 5,2) in der Zelle vorgelegt. In einem ersten Experiment wurde lediglich  $\text{CaCl}_2$  (in Acetatpuffer pH 5,2) zutitriert. Hier konnte keine signifikante Interaktion zwischen ScFlo11A und  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet werden. In einem zweiten Titrationsversuch wurde eine Lösung bestehend aus D(+)-Mannose und  $\text{CaCl}_2$  zutitriert; auch hier konnte keine Bindung beobachtet werden (Abbildung 33). Diese Experimente legen den Schluss nahe, dass zumindest



die in *E. coli* aufgereinigte, unglykosylierte Flo11A Domäne keine Bindung zu Calcium oder D(+)-Mannose aufweist.

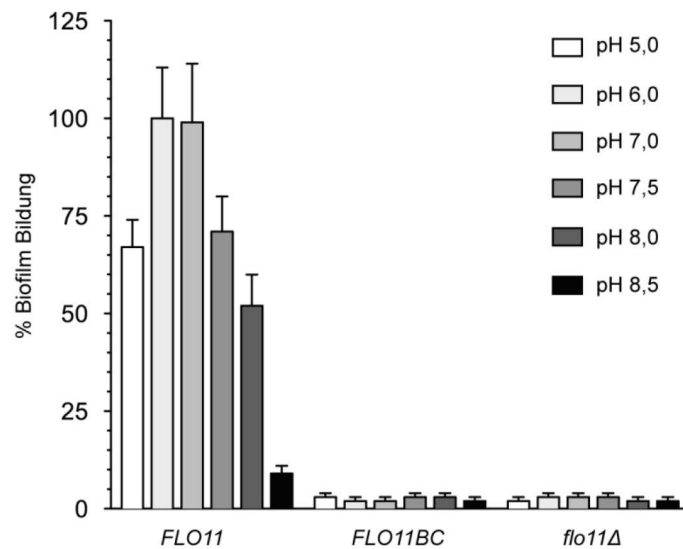


**Abbildung 33** Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) von Flo11A mit  $\text{CaCl}_2$  und D(+)-Mannose. (A) ITC Daten von Flo11A und  $\text{CaCl}_2$ . 315  $\mu\text{M}$  Flo11A wurden in der Zelle vorgelegt und 5 mM  $\text{CaCl}_2$  zugegeben. (B) ITC Daten von Flo11A plus  $\text{CaCl}_2$  und D(+)-Mannose. Eine Lösung aus 6 mM  $\text{CaCl}_2$  und 6 mM D(+)-Mannose wurden zu 315  $\mu\text{M}$  Flo11A zugegeben. In beiden Experimenten konnte keine Änderung des Wärmesignals beobachtet werden. Alle Experimente wurden in 20 mM Acetatpuffer pH 5,5; 150 mM NaCl durchgeführt.

#### 4.2.8 *In vivo* Studien zur Flo11A-Flo11A Interaktion

Mittels Oberflächenplasmonresonanz wurde eine pH-abhängige Flo11A-Flo11A Interaktion *in vitro* nachgewiesen. Um diese Ergebnisse auch *in vivo* nachzuweisen, wurden verschiedene Experimente in Kooperation mit der AG Mösch, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, durchgeführt. Dazu wurden von Dr. Stefan Brückner *S. cerevisiae* Zellen bereitgestellt, welche lediglich Flo11 auf der Zelloberfläche präsentieren, aber keine anderen Flokkuline. Mit diesen Zellen wurde die Biofilmbildung auf Plastik untersucht, da Plastikadhäsion ein weiteres Merkmal der Flo11-vermittelten Adhäsion darstellt<sup>77, 116</sup>. Es wurden zunächst drei Konstrukte hergestellt: Das Volllängengenen aus A, B und C-Domäne (*FLO11*); ein Konstrukt aus A- und B-Domäne (*FLO11BC*) und ein Konstrukt, in dem *FLO11* deletiert ist (*flo11Δ*). Zellen, welche diese drei Kon-

strukture auf der Zelloberfläche präsentieren, wurden bei verschiedenen pH-Werten auf Plastikadhäsion untersucht (Abbildung 34).



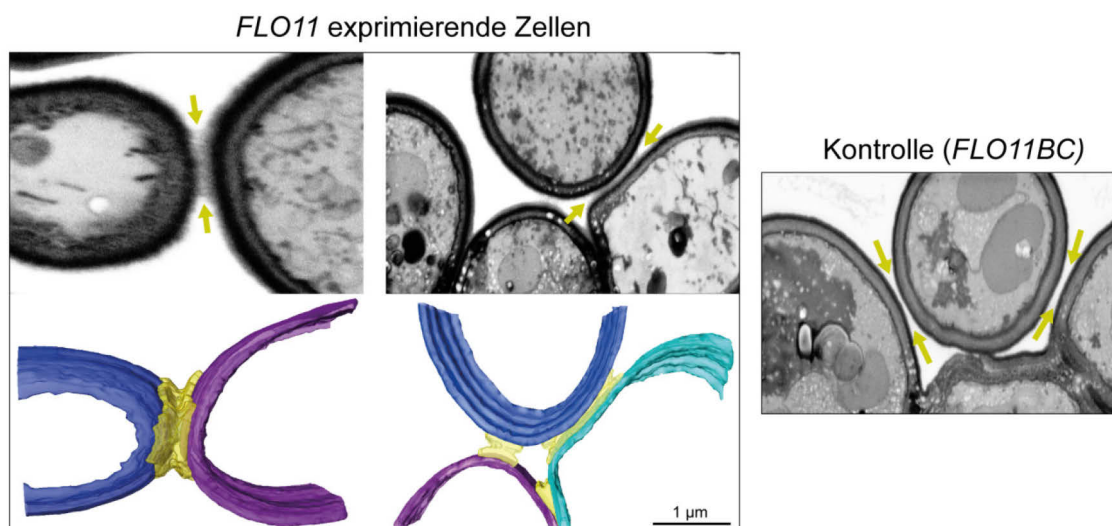
**Abbildung 34 Biofilmbildung in Abhängigkeit von der Flo11A Domäne und des pH-Werts.** Die Biofilmbildung auf Polystyrol wurde durchgeführt mit Hefestämmen, die *FLO11* exprimieren (*FLO11*), einer Variante, die nur die *FLO11BC* Domäne exprimiert (*FLO11BC*) und einer Deletionsvariante (*flo11Δ*), die kein *FLO11* exprimiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen. Durchführung von Dr. Stefan Brückner, AG Mösch.

Die Plastikadhäsion scheint stark von der A-Domäne abzuhängen, da sowohl die *flo11Δ*-Variante, als auch die *FLO11BC*, keine Adhäsion mehr zeigen. Das vollständige *FLO11* Konstrukt hingegen zeigt eine sehr effiziente Adhäsion bei pH 6,0 und 7,0, aber reduzierte Adhäsion bei pH 5,0 und 7,8 – 8,0 und eine vollständig inhibierte Biofilmbildung bei pH 8,5.

Diese pH Sensitivität stimmt mit der Verteilung der aromatischen Bänder und der oberflächen-exponierten sauren Aminosäuren überein. Die sauren Reste verursachen eine elektrostatische Abstoßung bei höherem pH. Allerdings scheint die *in vivo* Adhäsion im Vergleich mit den *in vitro* Analysen auch bei neutralem pH zu funktionieren. Dabei muss man bedenken, dass das negative Oberflächenpotential auf der Hefezelloberfläche (Zeta-Potential bis zu -40 mV) die pKs Werte von exponierten deprotonierbaren Gruppen beeinflusst, sodass eine Deprotonierung von Carboxylatgruppen bis ca. pH 7 verhindert sein kann<sup>213</sup>.

Um eine Flo11-vermittelt Adhäsion *in vivo* zu visualisieren, wurden mit den Flo11 präsentierenden Zellen und Zellen ohne Flo11 (Kontrolle) elektronenmikroskopische Untersuchungen mittels FIB-SEM durchgeführt. Diese wurden in Kooperation mit Dr. Daniel Rhinow vom MPI für Biophysik in Frankfurt verwirklicht.

Flo11 präsentierende *S. cerevisiae* Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und in eine Epoxidmatrix eingebettet. Solche Blöcke wurden mittels FIB-SEM auf Zell-Zell-Kontakte analysiert. Bei dieser bildgebenden Methode wird ein fokussierter Ionenstrahl (FIB, engl. *Focus Ion Beam*) zeilenweise über den gewünschten Bereich des Zellblocks geführt. Die dabei aus der Oberfläche heraustretenden Sekundärelektronen werden detektiert und ermöglichen eine Tomographie der Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 35).



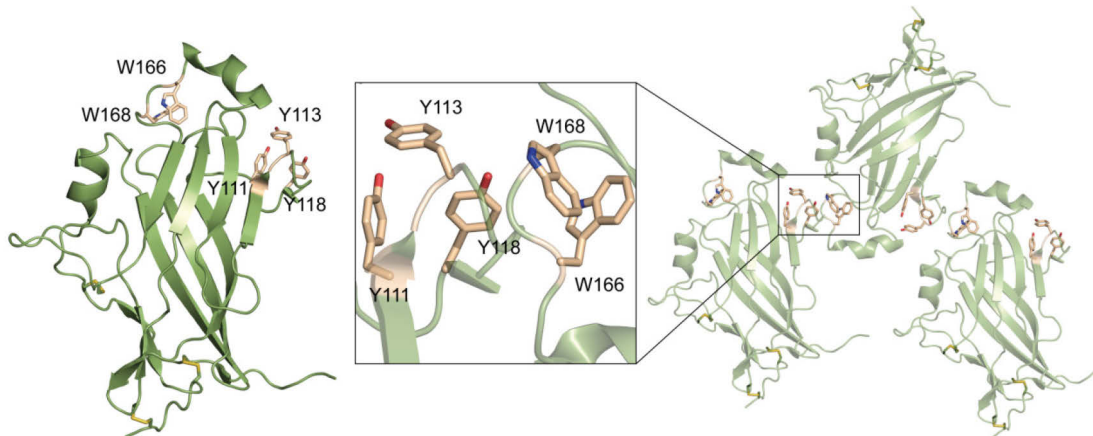
**Abbildung 35** FIB-SEM-Tomographie von Zell-Zell-Kontakten in *FLO11* exprimierenden *S. cerevisiae* Zellen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die filamentöse Struktur der Zell-Zell-Kontakte (Pfeile). Die 3D Rekonstruktionen der Zellwände von verschiedenen, *FLO11*-exprimierenden Zellen sind in blau, türkis und lila dargestellt, während die Flo11-Flo11-Interaktionsschicht in gelb gezeigt ist. Die Kontrolle auf der rechten Seite zeigt Zellen, die nur die *FLO11BC* Domäne exprimieren und keine Interaktionsstellen hervorbringen (Pfeile). Durchführung von Dr. Daniel Rhinow, MPI Frankfurt.

Für die Stämme, welche lediglich die *FLO11BC* Domäne auf der Zelloberfläche exprimieren, konnten zwar enge Zell-Zell-Kontakte beobachtet werden, aber keine offensichtlichen interzellulären Strukturen. Im Gegenzug wurde bei den *FLO11* exprimierenden Zellen ein Zwischenraum von ca. 100-200 nm ausgemacht, der mit filamentösem Material gefüllt war. Diese intrazellulären Fasern

korrespondieren in ihren Abmessungen zu oberflächenexponierten Flo11 Molekülen (Vollängenprotein: 1.325 Aminosäuren), da sie in der Kontrolle fehlen. Die 3D Rekonstruktionen dieser Zell-Zell-Kontakte demonstrieren Flo11-Flo11-Interaktionen, die sich bei Kontakt ausbilden. Dennoch scheint die Gesamtstruktur dieses interzellulären Materials eher ungeordnet.

#### 4.2.9 Mutationsstudien an aromatischen Resten von ScFlo11A

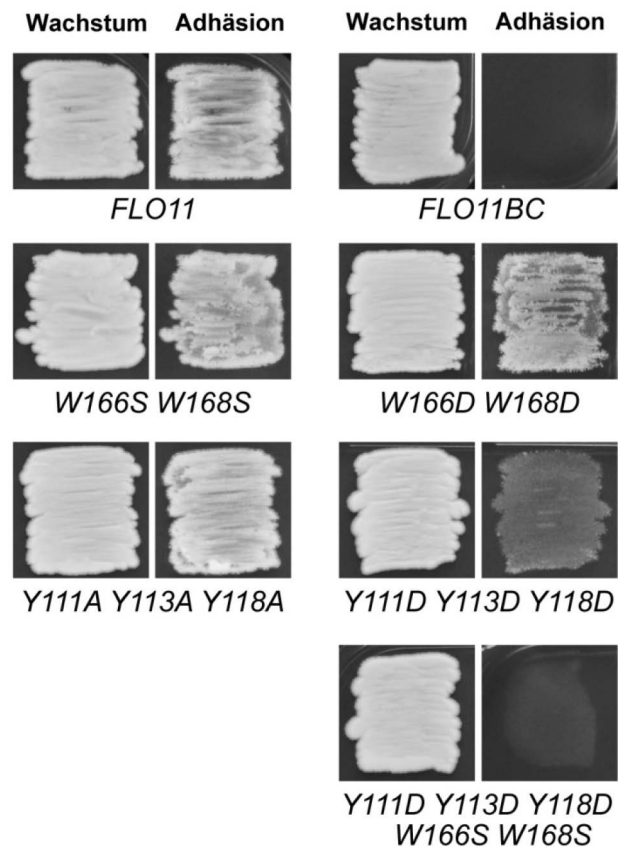
Die Kristallstruktur von ScFlo11A zeigte für ein lösliches Protein ungewöhnlich viele oberflächenexponierte aromatische Reste, welche zudem innerhalb der Flo11 Familie zum Großteil hochkonserviert und in zwei Bändern an den Enden der Domäne angeordnet sind. Diese Tryptophan- und Tyrosinreste bildeten Kristallkontakte in beiden Kristallformen aus. Dabei waren diese Kristallkontakte hauptsächlich im aromatischen Band I lokalisiert (Abbildung 36). Die anschließenden SPR Analysen zeigten eine homophile Flo11A-Flo11A Interaktion, die allerdings nur stattfand, wenn die Oberflächenladung der Flo11A Domäne reduziert ist. Diese Experimente legten eine hydrophobe Interaktion über die aromatischen Reste nahe.



**Abbildung 36** Tryptophan- und Tyrosinreste des *Aromatic band I*, die für eine Flo11A-Flo11A Interaktion verantwortlich sein könnten. Die Reste Y111, Y113, Y118, W166 und W168 bilden Kristallkontakte zwischen symmetrieverwandten Flo11A Domänen aus und sind in der Mitte vergrößert dargestellt.

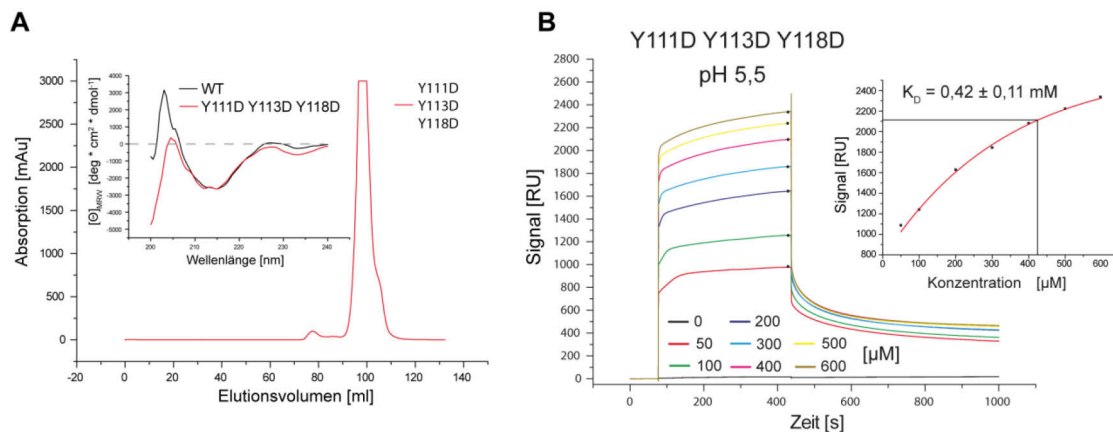
Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden mehrere Reste innerhalb des *Aromatic band I* mutiert und die Effekte der Flo11A-vermittelten Agar-Adhäsion *in vivo* untersucht. Diese Experimente wurden von Dr. Stefan Brückner durchgeführt. Der Schwerpunkt lag dabei auf den Resten Y111, Y113, Y118, W166 und W168. Die Flo11A Domäne scheint ausreichend und notwendig für die Agar-Adhäsion zu sein, da Stämme, die lediglich die Flo11BC Domäne auf der Zelloberfläche präsentieren, keine Adhäsion zeigen (Abbildung 37).

Punktmutationen gegen einzelne Reste innerhalb der A-Domäne führten zu fast keiner Beeinträchtigung der Adhäsion. Eine Doppelmutation der Reste W166 und W168 zu Serin, einer polaren Aminosäure, zeigte nur einen sehr geringen Effekt, der allerdings deutlicher wurde, wenn beide Reste zu Aspartat, einer sauren Aminosäure, ausgetauscht wurden. Ähnlich verhält es sich mit dem Tyrosin Cluster aus Y111, Y113 und Y118. Ein Austausch der drei Reste zu Alanin, einer unpolaren/hydrophoben Aminosäure, zeigte ein nahezu ähnliches Adhäsionsverhalten wie der Wildtyp Flo11. Wurden die drei Tyrosine allerdings gegen Aspartat getauscht, zeigte sich eine signifikant schlechtere Adhäsion an Agar. Wurden die Doppelmutante W166S, W168S und die Tripelmutante Y111D, Y113D, Y118D kombiniert, konnte die Adhäsion fast vollständig aufgehoben werden.



**Abbildung 37** *In vivo* Agar-Adhäsion von Hefestämmen, welche Flo11 bzw. Mutationsvarianten davon auf der Oberfläche präsentieren. Die Stämme wurden für drei Tage auf Agarplatten angezogen und vor (Wachstum) und nach Abwaschen von nicht-adhäsiven Stämmen (Adhäsion) fotografiert.

Um die Eigenschaften der Tripelmutante Y111D; Y113D; Y118D näher quantifizieren zu können, wurde diese auch *in vitro* untersucht. Dazu wurde die Gensequenz in den Expressionsvektor pET28a kloniert und analog zum Wildtyp in *E. coli* T7 SHuffle Express Zellen überexprimiert und aufgereinigt. Die Ausbeute war mit durchschnittlich 12 mg/L Kultur ähnlich wie die des Wildtyps und auch die präparative Gelfiltration zeigte ein ähnliches Elutionsverhalten. Die aufgereinigte Mutante wurde anschließend mittels CD Spektroskopie auf ihre Faltung hin untersucht, wobei sich die FernUV-Spektren des Wildtyps und der Mutante nicht unterschieden, sodass von einer korrekten Faltung der Mutante ausgegangen werden konnte (Abbildung 38A).



**Abbildung 38** *In vitro* Charakterisierung der Tripel-Tyrosin-Mutante Y111D; Y113D; Y118D. (A) Präparative Größenausschusschromatographie und CD Spektroskopie. Der Einschub zeigt FernUV Spektren des Wildtyps (schwarz) im Vergleich mit der Mutante (rot). (B) Oberflächenplasmonresonanz (Biacore) der Mutante bei pH 5,5. Die Mutante wurde auf einen CM5 Chip mit 4000 RU immobilisiert und für die Interaktionen in einem Konzentrationsbereich von 50 bis 600 µM in Lösung eingesetzt. Der Einschub zeigt die konzentrationsabhängige Veränderung in Plasmonresonanzsignalen (Punkte), welche mit einem 1:1 Gleichgewichts-Bindungsmodells *gefittet* werden konnten.

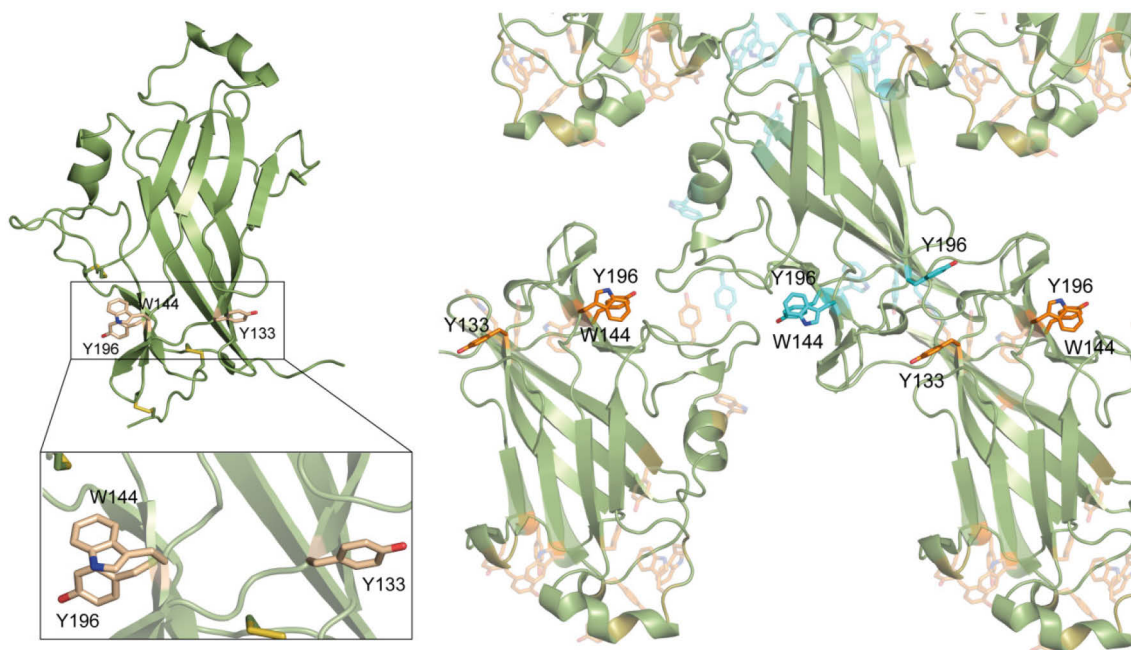
Im Anschluss wurde die Mutante mittels Oberflächenplasmonresonanz auf ihr homophiles Interaktionsverhalten und ihre Affinität hin untersucht. Die Analysen wurden analog zur Untersuchung des Wildtyps durchgeführt. Dazu wurde die Mutante auf einen CM5 Chip immobilisiert und ebenfalls in Lösung von 50 bis 600 µM eingesetzt. Der Konzentrationsbereich musste im Vergleich zum Wildtyp größer gewählt werden, da eine Absättigung des immobilisierten Liganden nur bei deutlich höheren Konzentrationen erreicht wurde.

Für die homophile Interaktion der Tripeltyrosinmutante bei pH 5,5 konnte eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von  $0,42 \pm 0,11 \text{ mM}$  ermittelt werden (Abbildung



38B). Die homophile Affinität des Wildtyps ist damit 21-mal höher im Vergleich mit der Mutante (Abbildung 38B). Diese Daten zeigen, dass die gesammelten Eigenschaften der aromatischen Cluster in Band I kritisch sind für eine homophile Flo11A-Flo11A Interaktion *in vivo* und *in vitro*.

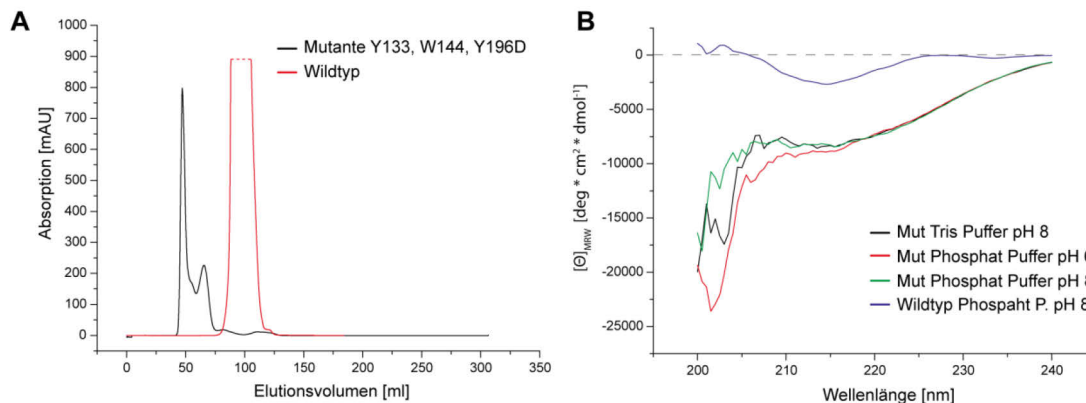
Um die Interaktionseigenschaften des unteren aromatischen Bandes (Aromatic band II) zu überprüfen, wurden die oberflächenexponierten Reste Y196, W144, Y133 ausgesucht und analog zur Tripeltyrosinmutante gegen Aspartat ausgetauscht (Abbildung 39). Diese Mutante zeigte in einem *in vivo* Waschassay eine ebenso stark verminderte Adhäsion, wie die Tripeltyrosinmutante. Allerdings bilden diese Reste innerhalb der Kristallpackung keine Kristallkontakte zueinander aus. Um diese Mutante näher zu untersuchen, wurde sie ebenfalls aufgereinigt und *in vitro* charakterisiert.



**Abbildung 39** Tryptophan und Tyrosinreste des unteren aromatischen bandes (*Aromatic Band II*). Die Reste wurden für eine Mutationsanalyse *in vitro* gewählt, da diese Mutante in einem *in vivo* Waschassay eine stark verminderte Adhäsion zeigte. Diese Reste bilden allerdings keine Kristallkontakte aus.

Die Mutante konnte löslich produziert werden, allerdings zeigte sie ein anderes Elutionsverhalten als der Wildtyp bei der Größenausschlusschromatographie (Abbildung 40A). Während der Wildtyp bei ca. 100 mL eluiert, war dies bei der Mutante bereits bei ca. 50 mL der Fall. Da das Durchbruchvolumen der Säule bei ca. 45 mL liegt, wurde vermutet, dass die Mutante nicht korrekt gefaltet ist.

Dennoch wurden die Fraktionen des Hauptpeaks bei 50 mL gesammelt, ankonzentriert und ein FernUV CD-Spektrum aufgenommen (Abbildung 40B). Dabei zeigt sich, dass die Mutante eine völlig andere, ungeordnete Faltung aufweist als der Wildtyp. Eine weitere Charakterisierung wurde daher nicht vorgenommen.



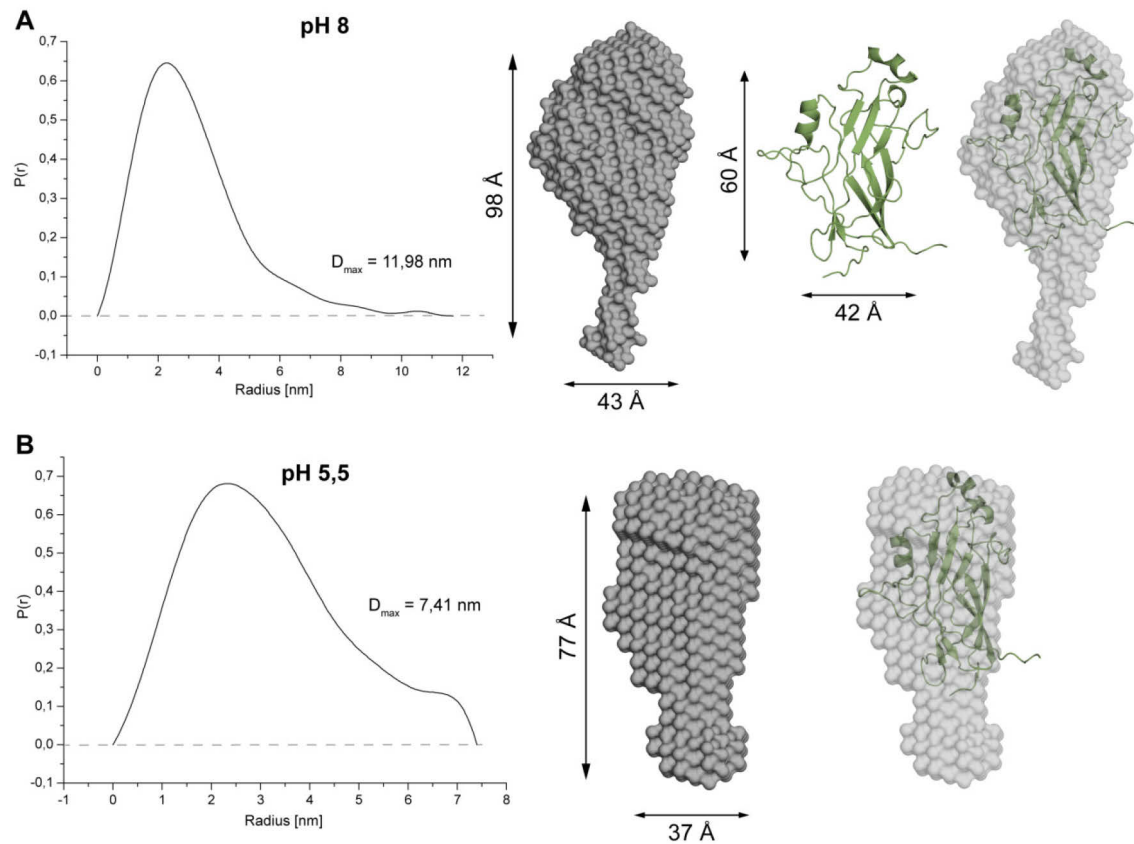
**Abbildung 40** *In vitro* Charakterisierung der S288C Flo11A Mutante Y133D, W144D, Y196D. (A) Präparative Gelfiltration der Mutante (schwarz) im Vergleich mit dem Wildtyp (rot). Der *peak* des Wildtyps ist nur bis 900 mAU dargestellt und durch eine gestrichelte Linie angezeigt. (B) CD FernUV Spektren der Mutante bei verschiedenen Puffern bzw. pH-Werten (schwarz, rot, grün) im Vergleich mit dem Wildtyp (blau). Sowohl Größenausschlusschromatographie, als auch CD Spektroskopie zeigen, dass die Mutation im unteren Band zu einer nicht-nativen Faltung führen.

## 4.2.10 SAXS Analysen der ScFlo11A Domäne

Die Rekonstruktion der Kristallpackung in Abschnitt 2.2.4 zeigte, dass Kristallkontakte durch aromatische Reste gebildet wurden. Um zu überprüfen, ob physiologisch relevante Dimerbildung in Lösung stattfindet, wurde ScFlo11A mittels Kleinwinkelstreuung (SAXS) untersucht. SAXS kann Daten zu Partikelform und Partikelgröße in Lösung von Strukturen von 1 bis 100 nm liefern. Dafür wurde ScFlo11 in verschiedenen Konzentrationen bei pH 8 und pH 5,5 eingesetzt. Ausgehend von den Daten aus der Oberflächenplasmonresonanz sollte bei pH 8 ScFlo11A als Monomer vorliegen und bei pH 5,5 sollten sich konzentrationsabhängig dimere Spezies bilden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt. Die *Pair-distribution function* zeigt die Distanzverteilung innerhalb des Partikels. Sie kann durch eine Fourier Transformation direkt aus der Streukurve berechnet werden. Aus dieser Kurve kann dann z.B. die maximale Distanz, die in dem gestreuten Partikel beobachtet werden kann ( $D_{\text{max}}$ ), abgelesen werden.



Von der *1D pair-distribution function* kann anschließend eine 3D Hülle berechnet werden.



**Abbildung 41** SAXS Experimente von ScFlo11A bei verschiedenen pH-Werten. (A) SAXS Experimente von ScFlo11A bei pH 8. (B) SAXS Experimente von ScFlo11A bei pH 5,5. Der Konzentrationsbereich lag bei 1-5 mg/mL. Die *pair-distribution function* wurde mit Hilfe von GNOM berechnet<sup>214</sup>.  $D_{\max}$  wurde durch Autognom bestimmt. Die Berechnung der Hülle erfolgte mit DAM-MIF<sup>199</sup>. Die Strukturen von ScFlo11A wurden manuell in die Hüllen eingepasst.

Die SAXS Daten zeigen, dass ScFlo11A sowohl bei pH 8, als auch bei pH 5,5 als monomere Spezies vorzuliegen scheint, wie auch anhand der berechneten Hüllen zu sehen ist. Die gelöste Struktur wurde manuell in die Hülle eingepasst. Die linke Seite der Kristallstruktur zeigt konvex geformte Loop-Regionen, die sich auch in den Hüllen wieder finden. Der Stab-ähnliche Ansatz der Hülle findet sich hingegen nicht in der Kristallstruktur, da sich die Struktur in Lösung in einigen Punkten von der Kristallstruktur unterscheidet. In der Kristallstruktur ist der His<sub>6</sub>-Tag nicht definiert, welcher aber  $D_{\max}$  erhöhen und zur Heterogenität der modellierten Molekülhülle beitragen kann<sup>215</sup>. Zudem verfügt das Protein in Lösung über zusätzliche Aminosäure-Reste, die von dem Expressionsvektor stammen. Ein weiterer Punkt ist, dass *ab initio* Methoden, welche eine 3D Hülle

aus einer 1D Streukurve zu rekonstruieren wollen, nicht nur eine einzige Lösung liefern<sup>216</sup>. Im Anhang befinden sich die Streukurven, *Guinier Plots* und *Kratky Plots*.

### 4.3 Die Flo11A Domäne aus *Saccharomyces cerevisiae* $\Sigma$ 1278b

Die Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b stellt ein Ortholog zur Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae* S288C dar und unterscheidet sich von letztgenannter hauptsächlich durch eine Insertion von 15 Aminosäuren (Abbildung 42). Desweiteren gibt es ein weiteres Cysteinpaar, C128/C179, welches vermutlich eine zusätzliche Disulfidbrücke ausbilden kann.

```

ScFlo11A  FPTALVPRGSSEGTSCNSIVNGCPNLDFNWHMDQQNIMQYTLDVTSVSWVQDNTYQITIHF
EFlo11A  FPTALVPRGSSEGTSCNSIVNGCPNLDFNWHMNQQNIMQYTLDVTSVSWVQDNTYQITIHF
*****:*****

ScFlo11A  VKGKENIDLKYLWLSLKIIGVTGPKGTQVLYGYNE-----NTYLIDNPDTDF
EFlo11A  VKGEENIDLKYLSSLKIIGVTGPKDQVLYGYDENTDWIDNPLVSRCDENTYLIDNPDTDF
***:***** *****:*****

ScFlo11A  TATFEVYATQDVNSCQVWMPNFQIQFEYLQGSAAQYASSWQWGTTSFDLSTGCNNYDNQG
EFlo11A  TATFEVYATQDVNSCQVWMPNFQIQFEYLQGSAAEYACSWEWGTTSFYLSSTGCNNYDNQG
*****:*****:*****:*****

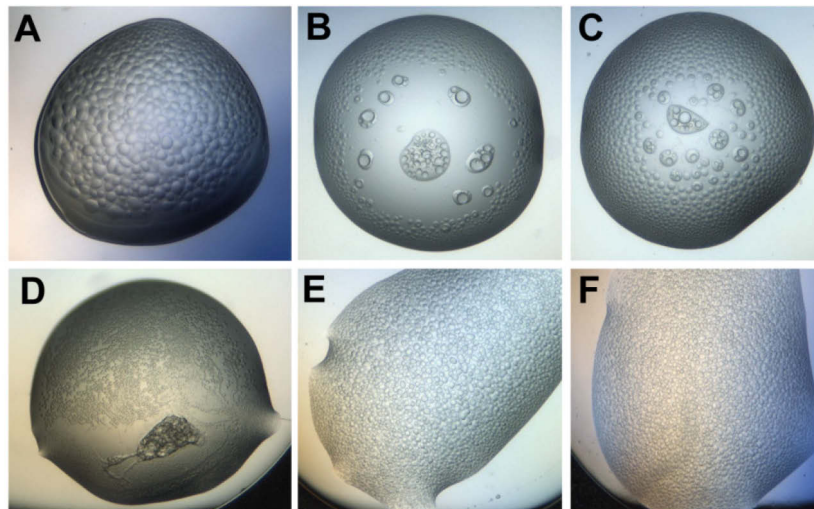
ScFlo11A  HSQTDFPGFYWNIDCDNNCGGKSS-
EFlo11A  YSQTDFPGFYWNIDCDNNCAPVPTPS
:*****.:

```

**Abbildung 42** Sequenzalignment der beiden Flo11A Domänen aus *S. cerevisiae* S288C und  $\Sigma$  1278b. Der größte Unterschied besteht in einer Insertion von 15 Aminosäuren (blau) und einer möglichen weiteren Disulfidbrücke zwischen C128 und C179. Die anderen Disulfidbrücken bilden den Cysteine sind konserviert und gelb hervorgehoben.

Bei *in vivo* Experimenten (AG Mösch) zeigte diese Flo11A Variante eine deutlich stärkere Adhäsion an Agar als die Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae* S288C. Zu Beginn dieser Arbeit lag die Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b kloniert in pET28a vor und konnte so analog zu ScFlo11A aufgereinigt werden. Die Ausbeute war mit etwa 10-12 mg/L Kultur vergleichbar mit ScFlo11A und  $\Sigma$ 1278b zeigte eine ebenso hohe Löslichkeit. Für die Kristallisation wurde das Protein daher auch in einem Acetatpuffer nahe des *pI* eluiert. Dabei wurde  $\Sigma$ 1278b sowohl mit His<sub>6</sub>-Tag als auch die thrombinbehandelte Varian-

te ohne His<sub>6</sub>-Tag eingesetzt in Konzentrationen von 40 bis 50 mg/mL. Zum Einsatz kamen die Screens *Anions*, *Classics Lite*, *JCSG+*, *JCSG Core I-IV*, *MBC I* und *II*, *Morpheus*, *PACT* und darauf aufbauende Optimierungen. Da die spontane Kristallisation bei ScFlo11A sehr schwierig war, wurden auch Nanopartikel als keimbildende Katalysatoren eingesetzt. Es konnten allerdings keine Kristalle erhalten werden (Abbildung 43). Lediglich eine Phasentrennung konnte in mehreren Bedingungen beobachtet werden.

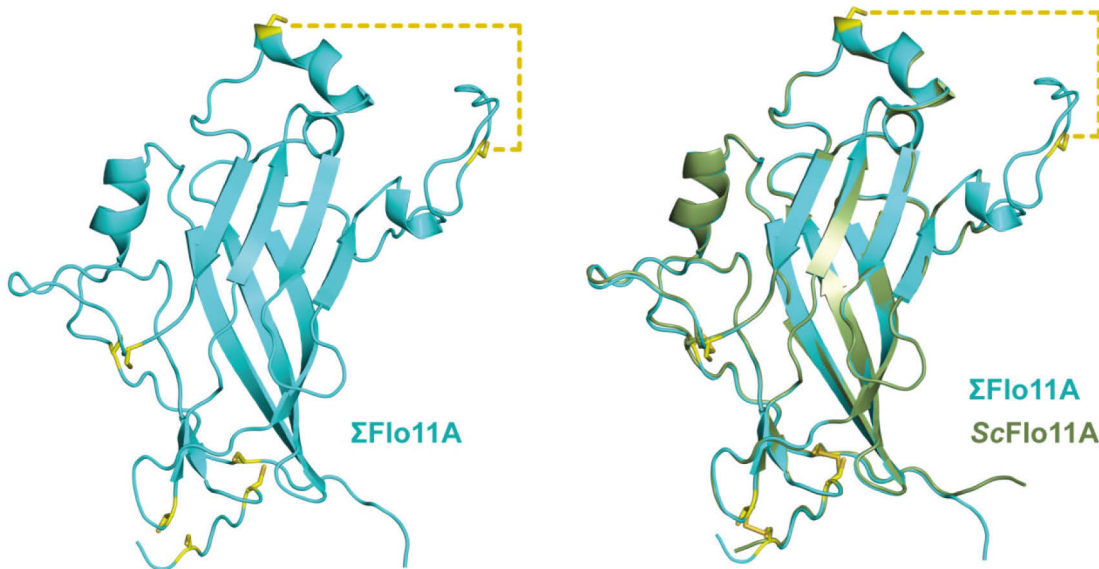


**Abbildung 43** Kristallisation von  $\Sigma 1278b$  in verschiedenen Bedingungen. (A) *Anions* H4. (B) *JCSG Core I* B7. (C) *JCSG Core I* C7. (D) *MBC II* A11. (E) Optimierung 1: 0,1 M Na<sub>3</sub>Citrat, pH 6; 1 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 4 % PEG 4000. (F) Optimierung 2: 0,1M Na<sub>3</sub>Citrat, pH 8; 1,5 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 12 % PEG 4000. Für A-D wurde  $\Sigma 1278b$  ohne His<sub>6</sub>-Tag verwendet, für E und F  $\Sigma 1278b$  ohne His<sub>6</sub>-Tag. Die Kristallisation wurde bei 4 °C durchgeführt.

Da es nicht möglich war, Kristalle von  $\Sigma 1278b$  zu erhalten, wurde ein Homologiemodell mit Hilfe der Software *Modeller*<sup>180</sup> und der Struktur von ScFlo11A als Templat erstellt (Abbildung 44).

Der Vergleich der beiden Strukturen zeigt, dass die Gesamtstruktur mit einem r.m.s.d. von 0,192 Å über 142 Atome sehr ähnlich ist. Drei Disulfidbrücken scheinen konserviert vorzuliegen, während eine vierte zwischen der  $\Sigma$ -spezifischen Insertion und der 3<sub>10</sub>-Helix durch eine gestrichelte Linie angedeutet ist. Die Insertion liegt strukturell auf Höhe des Tripeptidclusters der ScFlo11A Domäne, der an der Ausbildung von Kristallkontakten in der Kristallstruktur von ScFlo11A beteiligt war. Möglicherweise stört die Insertion die Ausbildung von Kristallkontakten, weshalb keine Kristalle erzeugt werden konnten. Die Kristallisationsexperimente in Abbildung 43 zeigen, dass es lediglich zur

Phasentrennung kommt. Phasentrennung ist gekennzeichnet durch kleine Tropfen, welche erhöhte Proteinkonzentration aufweisen, was eine Vorstufe zur Kristallbildung sein kann.



**Abbildung 44** Homologiemodell der Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b (blau) im Vergleich mit der Kristallstruktur von Flo11A aus *S. cerevisiae* S288C (grün). Drei Disulfidbrücken sind konserviert, während eine mögliche weitere durch eine gestrichelte Linie angedeutet ist. Der r.m.s.d. beträgt 0,192 Å über 147 C $\alpha$  Atome.

Mit Hilfe des Programms *MODELLER* wurde die vierte Disulfidbrücke zwischen den Cystein-Resten geknüpft und über MD Simulation auf konformationelle Stabilität überprüft (Abbildung 45). In einer Simulation über 100 ns zeigte sich, dass  $\Sigma$ Flo11A eine stabile Konformation beibehält. Durch die Formierung der Disulfidbrücke scheint sich die  $3_{10}$ -Helix, so wie in Abbildung 45 zu sehen ist, auf einen Teil zu verkürzen. Auch wenn das Modell bzw. die Simulation nicht die Kristallstruktur ersetzen kann, zeigte sich, dass die Insertion und die vierte Disulfidbrücke einen strukturellen Einfluss auf Flo11A haben.

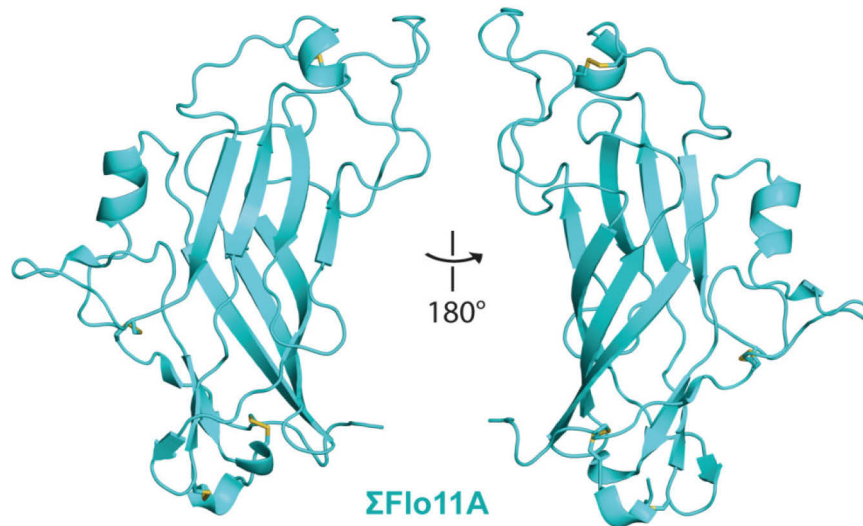


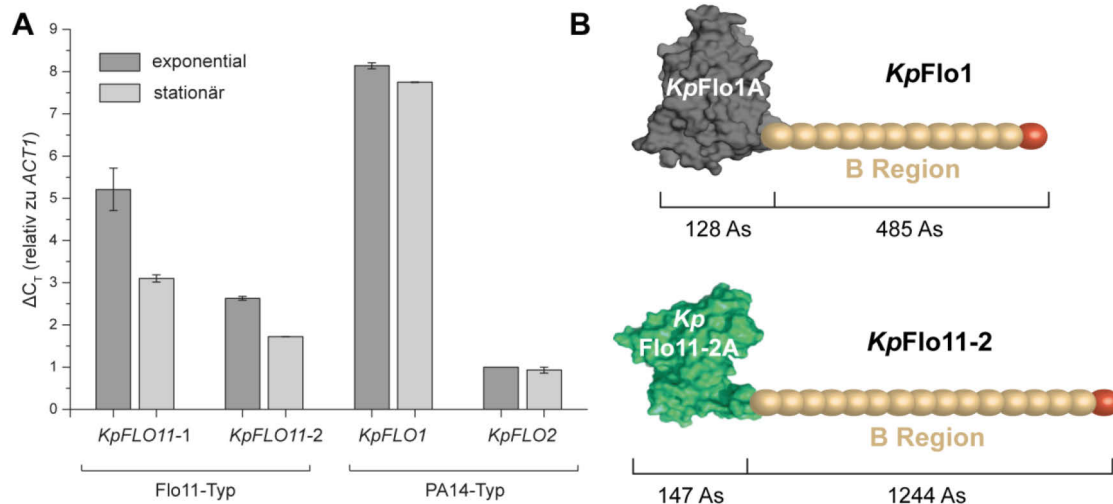
Abbildung 45 Screenshot der MD Simulation des Homologiemodells von  $\Sigma$ Flo11A (Templat: ScFlo11A 4UYR) mit ausgebildeter vierter Disulfidbrücke. Die MD Simulation wurde für 100 ns, 300 K, konstantem Druck und ff14sb Kraftfeld mit dem Programm AMBER14<sup>217</sup> durchgeführt.

#### 4.4 Expression von Flokkulinen in *Komagetaella pastoris*

Die Flokkuline des PA14- und Flo11-Typs wurden in *S. cerevisiae* bereits sehr gründlich untersucht. Die methylotrophe Hefe *Komagetaella pastoris* verfügt ebenfalls über Flokkuline, allerdings ist über ihre Regulation und adhäsiven Eigenschaften nicht viel bekannt. In einer Studie von Zhang *et al.* wurde *K. pastoris* nach GPI-verankerten Zellwandproteinen untersucht<sup>200</sup>. Dabei wurden Flo5- und Flo11-artige Orthologe identifiziert. Da die Sequenzidentität zu den *S. cerevisiae* Pendants auf 25 bis 30 % limitiert ist, wurde in dieser Arbeit das Transkriptom von *K. pastoris* GS115 auf Expression der *FLO5*- und *FLO11*-artigen Gene untersucht (Abbildung 46). *K. pastoris* Kulturen wurden in YEPD Medium in exponentieller ( $OD_{600} \approx 0,8$ ) und stationärer Wachstumsphase ( $OD_{600} \approx 2,3$ ) geerntet und die RNA extrahiert. Die gebildeten Transkriptmengen wurden durch qRT-PCR relativ zur Expression des Haushaltsgens *ACTIN* (*ACT1*) bestimmt. *K. pastoris* verfügt über zwei Flo11-artige und zwei Flo5-artige Proteine, die alle unter normalen Laborbedingungen produziert werden. Die relativen Expressionsmengen von *KPFLO11-1* und *KPFLO11-2* sind vergleichbar, obwohl die Expression von *KPFLO11-1* fast zweimal so stark ist. Die Expression der Flo5-artigen *KPFLO1* und *KPFLO2* unterscheidet sich dahingehend, dass *KPFLO2* ähnlich stark wie das Haushaltsgen *ACTIN* exprimiert wird, während *KPFLO1*



eine ca. achtmal so hohe Menge an gebildetem Transkript aufweist. Interessanterweise bilden die Flo11-artigen Gene *KPFLO11-1* und *KPFLO11-2* während der exponentiellen Wachstumsphase mehr Transkript als in der stationären Phase.



**Abbildung 46** *In vivo* Analyse und Domänenarchitektur von PA14-Typ und Flo11-Typ Proteinen aus *K. pastoris*. (A) Bestimmung der relativen Transkriptmengen von PA14-Typ und FLO11-Typ Orthologen in *K. pastoris* GS115 mittels qRT-PCR. Die Genexpression wurde auf *ACT1N* normalisiert mit der  $\Delta C_T$  Methode. (B) Domänenarchitektur von PA14-Typ und Flo11-Typ Proteinen aus *K. pastoris*. Die repetitiven Einheiten der B-Domäne sind als kleine Kugeln dargestellt. Die Längen der einzelnen Domänen sind in Aminosäuren angegeben (As).

Zusammen mit den Ergebnissen der Studie von Zhang *et al.*<sup>200</sup> kann für die *FLO5*- und *FLO11*-artigen Orthologe in *K. pastoris* deshalb gesagt werden, dass sie exprimiert (diese Arbeit) und in der Zellwand verankert werden (Zhang *et al.*).

#### 4.5 Die Flo11A1 Domäne von *KpFlo11-1* aus *K. pastoris*

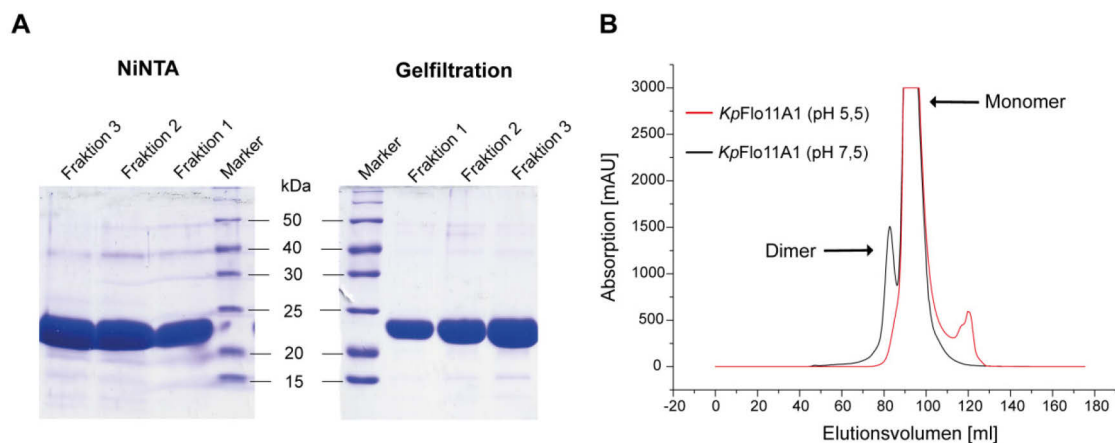
Die Flo11A Domäne kommt fast ausschließlich im Reich der Pilze vor. Dabei findet sich die Flo11A Domäne meistens am N-Terminus nach einer Signalsequenz für den Export zur Zellwand. Es gibt allerdings auch Flo11 Orthologe mit bis zu drei Flo11A Domänen in verschiedenen Anordnungen. Das Genprodukt von *KPFLO11-1* aus *K. pastoris* (Uniprot: C4R2D7) besitzt zwei Flo11A Domänen. Jede Flo11A Domäne davon hat eine Länge von 158 Aminosäuren, welche durch eine Serin/Threonin-reiche B1 Linkerregion getrennt werden. Diese ist höchstwahrscheinlich stark glykosyliert (Abbildung 47A). Die beiden Flo11A



*KpFlo11A1* auf der Zelloberfläche präsentiert wird und in diesem *in vivo* Assay ähnliche Adhäsionseigenschaften aufweist wie *ScFlo11A* aus *S. cerevisiae* (Abbildung 47B).

#### 4.5.1 Produktion und Aufreinigung von *KpFlo11A1*

Klonierung, Expression und Aufreinigung wurden analog zu *ScFlo11A* durchgeführt. *KPFLO11A1* wurde mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in den Expressionsvektor pET28a kloniert und im *E. coli* T7 SHuffle Express überexprimiert. *KpFlo11A1*-His<sub>6</sub> besitzt ein Molekulargewicht von 21989,4 Da, einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,51 und einen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{280}$ ) von 59400 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Diese physiko-chemischen Eigenschaften sind denen von *ScFlo11A* ähnlich. Im Rahmen der Aufreinigung konnte nahezu sauberes Protein erhalten werden (Abbildung 48A). Die Ausbeute lag dabei ebenfalls zwischen 12 und 14 mg pro Liter Kultur. Bei der präparativen Gelfiltration zeigte sich bei Verwendung eines Laufpuffers von pH 7,5 neben der monomeren Spezies auch ein Peak bei der Größe des Dimers von *KpFlo11A1*. Bei einem pH von 5,5 wurde dagegen ausschließlich monomeres *KpFlo11A1* erhalten (Abbildung 48B).



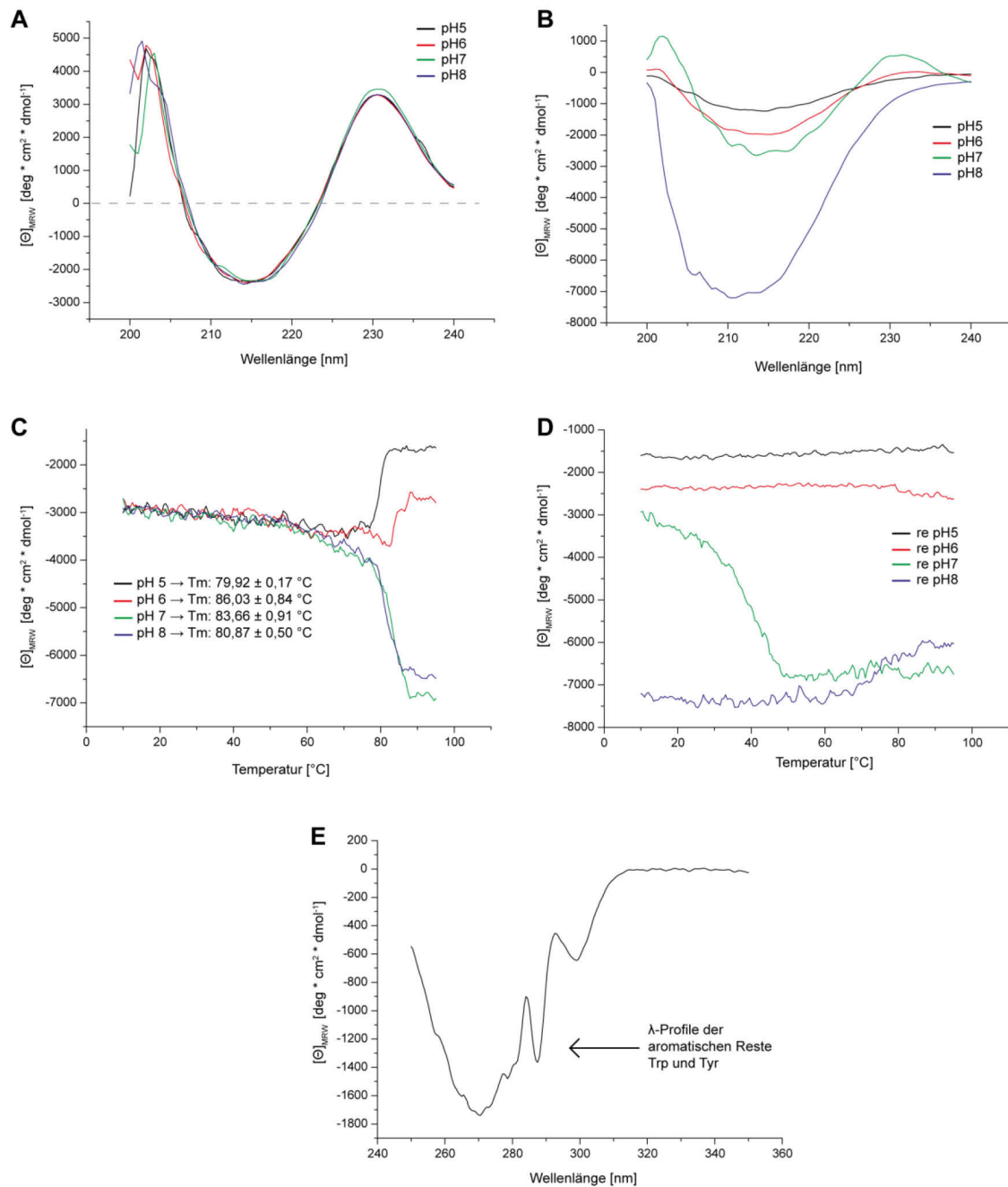
**Abbildung 48 Aufreinigung von *KpFlo11A1*.** (A) NiNTA und Gelfiltration von *KpFlo11A1*. Die Elution bei der NiNTA erfolgte mit 100 mM Imidazol. Nach der Gelfiltration konnte sauberes *KpFlo11A1* erhalten werden. (B) Chromatogramm der Gelfiltration. Die Elution erfolgte in 20 mM Acetatpuffer (pH 5,5) und 20 mM HEPES Puffer (pH 7,5). Bei pH 7,5 tritt eine dimere Spezies auf, die bei pH 5,5 nicht zu beobachten ist.



#### 4.5.2 CD Spektroskopie von *KpFlo11A1*

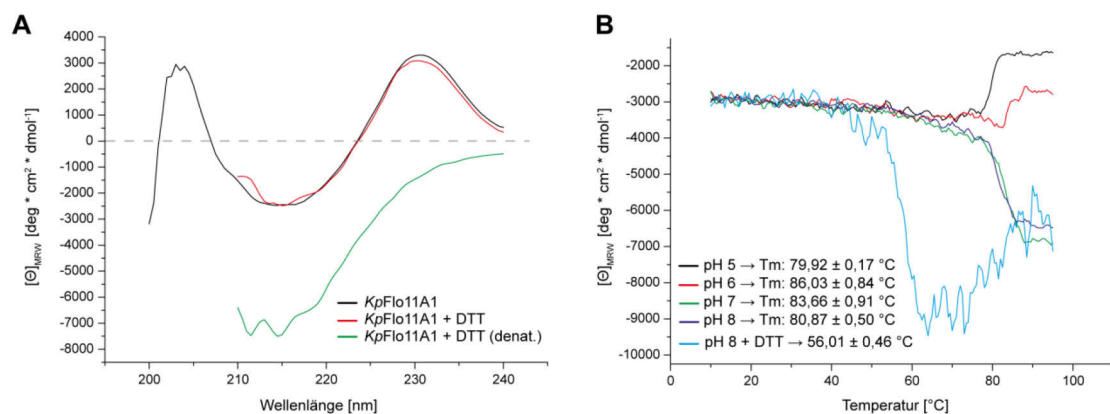
Eine erste Charakterisierung von *KpFlo11A1* wurde mittels CD Spektroskopie bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (Abbildung 49).

Das FernUV Spektrum zeigt ein Spektrum mit hohen Anteilen an  $\beta$ -Strukturelementen, wobei diese unabhängig von den verwendeten pH-Werten sind. Bei 230 nm tritt ein Peak auf, der in dem FernUV-Spektrum von ScFlo11A nicht auftrat und charakteristisch für *KpFlo11A1* zu sein scheint. Zwischen pH 6 und 7 weist diese Flo11A Domäne die größte Faltungstabilität auf, wie die Schmelzpunktanalyse ergab. Bei pH 7 scheint zudem eine teilweise Rückfaltung möglich, da der Verlauf des FernUV Spektrums vor und nach der Hitzedenaturierung ähnlich ist. Die Maxima und Minima bei 230 nm und 215 nm sind noch vorhanden, aber etwas unterschiedlich ausgeprägt. Bei den pH-Werten 5, 6 und 8 ist keine Rückfaltung möglich. Hier zeigen die FernUV Spektren nach Hitzedenaturierung möglicherweise ebenfalls teilweise gefaltetes Protein, wie es dem *molten globule state* entspricht (siehe 2.2.5). Im NahUV CD-Spektrum sind analog zu ScFlo11A die  $\lambda$ -Profile der aromatischen Aminosäuren zu erkennen. Ein definierter *Peak* bei 300 nm entspricht der Absorption von Tryptophan, während der *Peak* bei 285 nm der Aminosäure Tyrosin zuzurechnen ist.



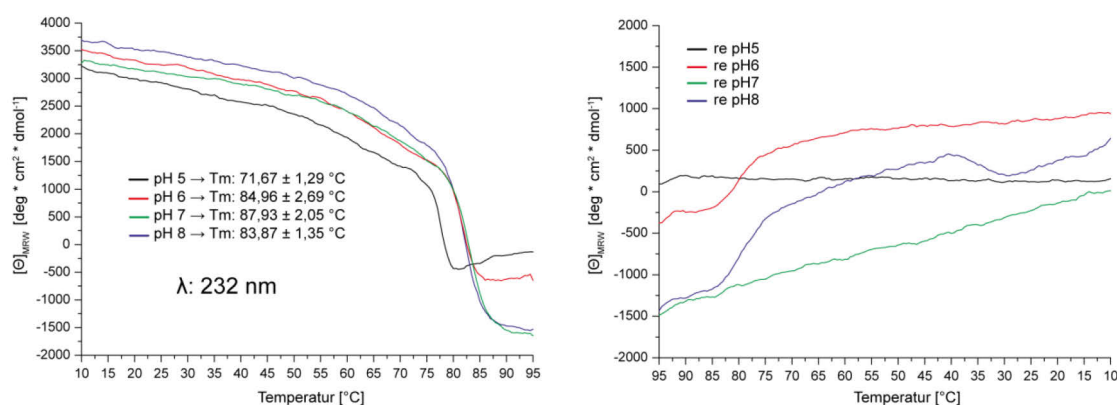
**Abbildung 49** CD-Spektroskopie der Flo11A Domäne aus *K. pastoris*. **(A)** Fern-UV CD-Spektrum bei verschiedenen pH-Werten. Der pH scheint keinen Einfluss auf die Sekundärstrukturelemente zu haben. Das Spektrum zeigt, dass die Flo11A Domäne hauptsächlich aus  $\beta$ -Strukturelementen besteht. Auffällig ist ein verhältnismäßig großer Peak bei 230 nm. **(B)** Fern-UV CD-Spektrum von KpFlo11A1 nach Hitzedenaturierung. Die native Struktur wird nicht wieder erreicht. Dennoch lässt sich bei pH 7 eine teilweise Rückfaltung erreichen. **(C)** Schmelzpunktanalyse von KpFlo11A1 bei verschiedenen pH-Werten, aufgenommen bei  $\lambda = 215 \text{ nm}$ . **(D)** Rückläufiger Temperaturscan nach Hitzedenaturierung. **(E)** Nah-UV CD-Spektrum von KpFlo11A1 bei verschiedenen pH-Werten. Die  $\lambda$ -Profile verweisen auf die Existenz der aromatischen Aminosäuren Trp und Tyr.

Auffällig ist der verhältnismäßig große *Peak* bei 230 nm des FernUV Spektrums von *KpFlo11A1*. Anhand der Primärsequenz von *KpFlo11A1* und des NahUV CD-Spektrums zeigt sich, dass *KpFlo11A1* ähnlich viele aromatische Aminosäuren besitzt wie *ScFlo11A*. Desweiteren verfügt es über 8 Cysteine, die vermutlich an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind. Disulfidbrücken zeigen eine schwache Absorption in der Region bei 260 nm<sup>152</sup>. Um den Einfluss der Disulfidbrücken auf die Ausbildung des *Peaks* bei 230 nm zu überprüfen, wurde *KpFlo11A1* mit 10 mM DTT inkubiert um die Disulfidbrücken zu reduzieren. Unter diesen Bedingungen wurde ein FernUV CD-Spektrum bis 210 nm aufgezeichnet, da DTT eine starke Absorption in der FernUV Region von 210 bis 190 nm zeigte (Abbildung 50). Der *Peak* bei 230 nm ist auch in Gegenwart von 10 mM DTT im FernUV Spektrum vorhanden, jedoch nicht mehr nach Hitzedenaturierung. Eine Schmelzpunktanalyse ergab, dass die Zugabe von 10 mM DTT eine drastische Reduzierung des Schmelzpunktes zur Folge hatte ( $T_m \sim 56^\circ\text{C}$ ). Da unter diesen Bedingungen die Cysteine reduziert sind und damit die Bildung von Disulfidbrücken nicht möglich ist, wird der hohe Schmelzpunkt von durchschnittlich  $80^\circ\text{C}$  von *KpFlo11A1* zum Großteil von den ausgebildeten Disulfidbrücken verursacht. Der *Peak* bei 230 nm rührt daher wahrscheinlich nicht von den Disulfidbrücken, sondern von den aromatischen Aminosäuren.



**Abbildung 50** Einfluss der Disulfidbrücken von *KpFlo11A1* auf das FernUV CD-Spektrum und die Faltungsstabilität. (A) FernUV CD-Spektrum von *KpFlo11A1* (schwarz), mit 10 mM DTT (rot) und nach Hitzedenaturierung (grün). (B) Schmelzpunktanalyse von *KpFlo11A1* bei 215 nm bei verschiedenen pH-Werten und mit 10 mM DTT (türkis). Die Disulfidbrücken haben einen erheblichen Einfluss auf die Faltungsstabilität von *KpFlo11A1*.

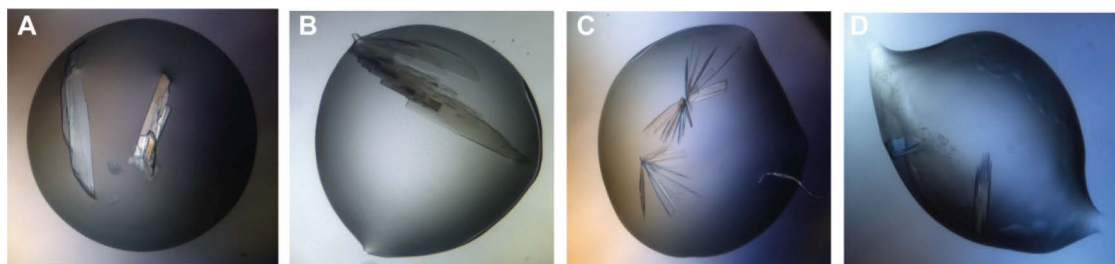
Um den auffälligen *Peak* bei 230 nm weiter zu analysieren, wurden bei 232 nm (lokales Maximum) ebenfalls Schmelzkurven aufgezeichnet (Abbildung 51). Diese Arbeiten wurden von Maximilian Mikolaiski im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt<sup>218</sup>. Dabei zeigten sich ähnliche Schmelzpunkte wie bei einer Wellenlänge von 215 nm (Abbildung 49C), was ein weiterer Beweis dafür ist, dass der Peak bei 230 nm von aromatischen Resten bzw. deren Umgebung herrührt und nicht von den Disulfidbrücken verursacht wird.



**Abbildung 51** Schmelzpunktanalyse (*melting temperature*, *Tm*) und Rückfaltung (*re*) von *KpFlo11A1* bei einer Wellenlänge von 232 nm. Durchgeführt von Maximilian Mikolaiski<sup>218</sup>

#### 4.5.3 Kristallisation von *KpFlo11A1*

*KpFlo11A1* zeigte zwischen pH 6 und 8 die größte Faltungsstabilität, wenn der Unterschied zwischen den einzelnen pH-Werten auch nicht so signifikant war, wie bei *ScFlo11A1*. Daher wurde *KpFlo11A1* für die Kristallisation in einem Puffer bei pH 7,5 in der präparativen Gelfiltration eluiert (20 mM HEPES pH 7,5; 50 mM NaCl). Bereits nach zwei Tagen bildeten sich in mehreren Bedingungen Kristalle bei 4 °C und einer Proteinkonzentration von 70 mg/mL.



**Abbildung 52** Kristallisation von *KpFlo11A1* bei 4 °C und einer Proteinkonzentration von 70 mg/mL. Die jeweiligen Bedingungen sind in Tabelle 33 aufgelistet.

Für eine Reproduktion wurde eine Proteinkonzentration von 35 mg/mL gewählt, da bei 70 mg/mL vermehrt Nadelbüsche (*Shower of needles*) auftraten. Die Reproduktion wurde im *Hanging Drop* Ansatz mit einem Volumen von 2 µL durchgeführt (1 µL Proteinlösung + 1 µL Mutterlösung) gegen ein Reservoir von 1 mL (Abbildung 52, Tabelle 33).

**Tabelle 33** Kristallisationsbedingungen von *KpFlo11A1*. Die Kristalle von A und D wurden zur Röntgenstrukturanalyse verwendet. Ac = Acetat.

Screen	<i>C. Lite</i> . Nr. 86	<i>PACT</i> Nr. 44	<i>JCSG+</i> Nr. 91	<i>MBC II</i> Nr. 68
Bild	A	B	C	D
Salz	0,2 M AcNH <sub>4</sub>	0,2 M NH <sub>4</sub> Cl	0,2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 M NaAc
Puffer	0,1 M NaAc; pH 4,6	0,1 M Tris, pH 8,0	0,1 M BIS-Tris, pH 5,5	0,1 M NaAc, pH 4,6
Präzipitant	15 % PEG 4000	12 % PEG 6000	25 % PEG 3350	12 % PEG 4000
Methode	Hanging Drop	Sitting Drop	Sitting Drop	Hanging Drop
Volumen	2 µL	600 nL	600 nL	2 µL
Temperatur	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C
Zusätze	-	-	-	-
Cryo	+30 % Glycerin			+30 % Glycerin

Kristalle, die aus den Bedingung Classics Lite Nr. 86 und MBC II Nr. 68 erhalten wurden, wurden in den jeweiligen Cryobedingungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Datensammlung am BESSY-II-Synchrotron durchgeführt (Tabelle 34). Von Kristallen aus den Bedingungen *PACT* Nr. 44 und *JCSG+* Nr. 91 wurden zwar ebenfalls Datensätze aufgenommen, aber aufgrund gleicher Kristallformen nicht weiter verfeinert.

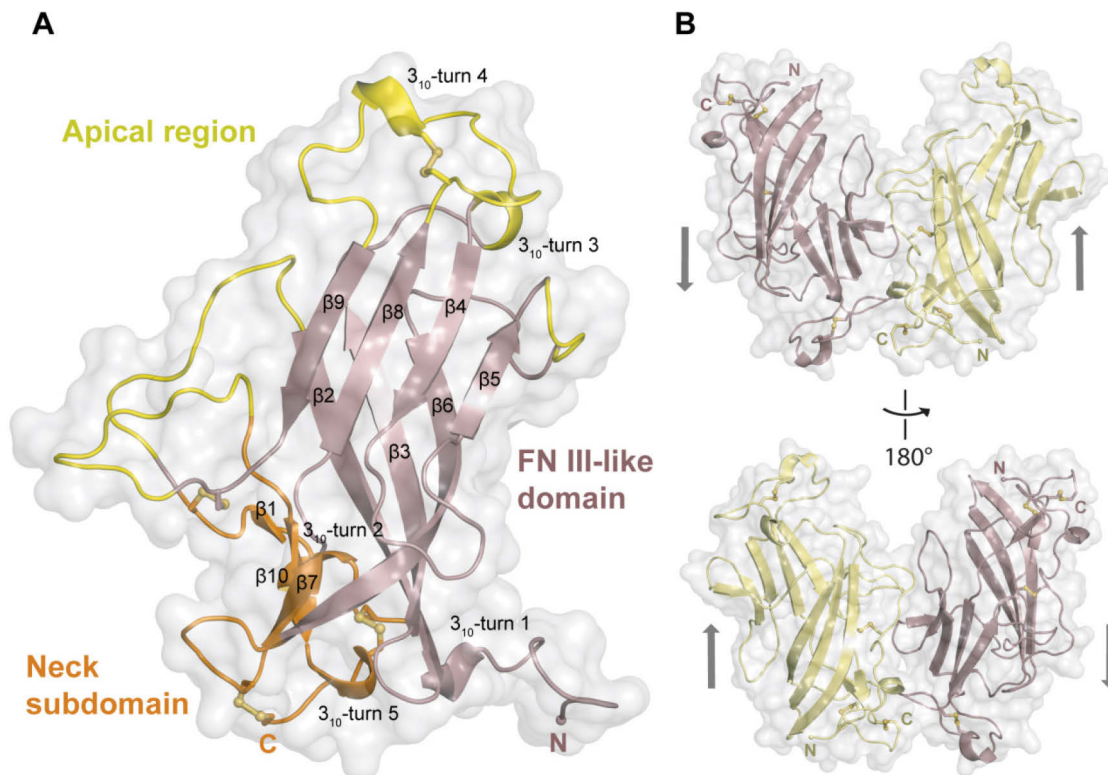
Tabelle 34 Statistiken zur Datensammlung, Prozessierung und Verfeinerung von KpFlo11A1 Kristallen.

Datensammlung & Prozessierung	KpFlo11A1 Kristallform I (5FV5)	KpFlo11A1 Kristallform II (5FV6)
X-ray Quelle	MX-14-1, BESSY II, Berlin, Germany	MX-14-1, BESSY II, Berlin, Germany
Detektor	Pilatus 6M	Pilatus 6M
Wellenlänge (Å)	0,977790	0,977790
Raumgruppe	$P2_12_12_1$	$P2_1$
Zellmaße ( $a, b, c$ Å) und Winkel (°)	35,54, 58,52, 76,55 90 90 90	37,44, 58,68, 85,27 90 96,56 90
Auflösung (Å)	30 – 1,4 (1,45 – 1,40)	42,36 – 2,0 (2,07 – 2,00)
Gesamtreflektionen	284209	76825
Multiplizität	6,7	3,2
Einzigartige Reflexe	42777	24319
$R_{\text{merge}}$ (%)	5,6 (45,6)	9,1 (51,9)
Vollständigkeit (%)	95,93	97,22
$I/\sigma(I)$	20,95 (4,3)	10,0 (2,9)
Mosaizität (°)	0,106	0,343
Wilson B-factor (Å <sup>2</sup> )	12,0	23,8
<b>Verfeinerungsstatistiken</b>		
Auflösung (Å)	30,0-1,40	42,36-2,00
$R_{\text{factor}}, R_{\text{free}}$ (%)	13,4, 17,9	22,4, 26,6
Reflektionen (working, test set)	29332, 1581	24300, 1239
Vollständigkeit (%)	95,9	97,3
r.m.s.d. :		
Bindungslängen (Å)	0,0121	0,0115
Bindungswinkel (°)	1,659	1,485
Anzahl Atome	1658	3114
Mittlerer $B$ Wert (Å <sup>2</sup> )	16,9	27,6

Die Integration und Datenreduktion erfolgte mit *XDS* sowie *XSCALE*. Das Phasenproblem wurde über Molekularen Ersatz mit dem Programm *Phaser-MR* aus dem *Phenix*-Paket gelöst. Eine Lösung mit der Kristallstruktur von ScFlo11A als Templat schlug fehl, da die Sequenzidentität zwischen *KpFlo11A1* und ScFlo11A lediglich bei 30 % liegt. Daher wurde mit der Software *MODELLER* ein Homologiemodell auf Grundlage der Primärsequenz von *KpFlo11A1* und der Struktur von ScFlo11A erstellt. Dieses Modell wurde dann zur Lösung über Molekularen Ersatz herangezogen. Die Modelbildung wurde mit *AutoBuild* durchgeführt. Verfeinerungen wurden durch manuelle Inspektion mittels *Coot* und den Verfeinerungsprogrammen *phenix.refine* bzw. *REFMAC5* aus dem *CCP4*-Packet durchgeführt. Die Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung sind in Tabelle 34 zusammengefasst. Für beide Strukturen wurden hohe Auflösungen von 1,4 und 2,0 Å erzielt.

#### 4.5.4 Die Kristallstruktur von *KpFlo11A1*

*KpFlo11A1* wurde in einer orthorhombischen Raumgruppe ( $P2_12_12_1$ ) mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit und in einer monoklinen Raumgruppe ( $P2_1$ ) mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit kristallisiert (Abbildung 53). In Raumgruppe  $P2_1$  werden die Kristallkontakte innerhalb des antiparallel orientierten Dimers hauptsächlich durch polare Interaktionen zwischen sechs Resten verursacht. Um die physiologische Relevanz dieser Dimerbildung zu untersuchen wurde eine *Interface* Analyse mit Hilfe des PDBePISA Servers durchgeführt<sup>219</sup>. Die Oberfläche dieses *Interface* hat eine Größe von 437 Å<sup>2</sup> mit einem *Complex Formation Significance score* (CSS) von 0,00. Der CSS gibt eine Wahrscheinlichkeit von 0 bis 1 an, ob es sich um ein Ergebnis der Kristallpackung handelt oder die Interaktion eine physiologische Rolle haben könnte. Der CSS von 0,00 für die Dimerbildung von *KpFlo11A1* zeigt, dass es sich hier höchstwahrscheinlich um ein Ergebnis der Kristallpackung handelt.



**Abbildung 53** Kristallstruktur der KpFlo11A1 Domäne aus *K. pastoris* mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit (A) und mit zwei Molekülen (B). Die Fibronectin Typ III Domäne ist in Braun, die Neck subdomain in orange und die Apical region in gelb dargestellt.

Die Topologie der Struktur von KpFlo11A1 ist auf den ersten Blick der Struktur von ScFlo11A ähnlich, zeigt aber auch unterschiedliche Elemente. KpFlo11A1 besitzt drei  $\beta$ -Faltblätter, aber nur sehr geringe  $\alpha$ -helikale Anteile.  $\beta$ -Faltblatt I wird von den  $\beta$ -Strängen 2, 3 und 6 gebildet;  $\beta$ -Faltblatt II von den Strängen 4, 5, 8 und 9 und  $\beta$ -Faltblatt III von den Strängen 1, 7 und 10. Die beiden  $\beta$ -Faltblätter I und II bilden einen  $\beta$ -Sandwich, der die Fibronectin Typ III Domäne ausmacht, während  $\beta$ -Faltblatt III die Neck subdomain bildet. Diese stellt eine Verbindung zu der B1 und B2 Region dar, wodurch eine stabile Präsentation der Flo11A Domäne außerhalb der Zelle gewährleistet werden kann. Die Apical region liegt auf der Fibronectin Typ III Domäne und wird hauptsächlich aus Loops gebildet.

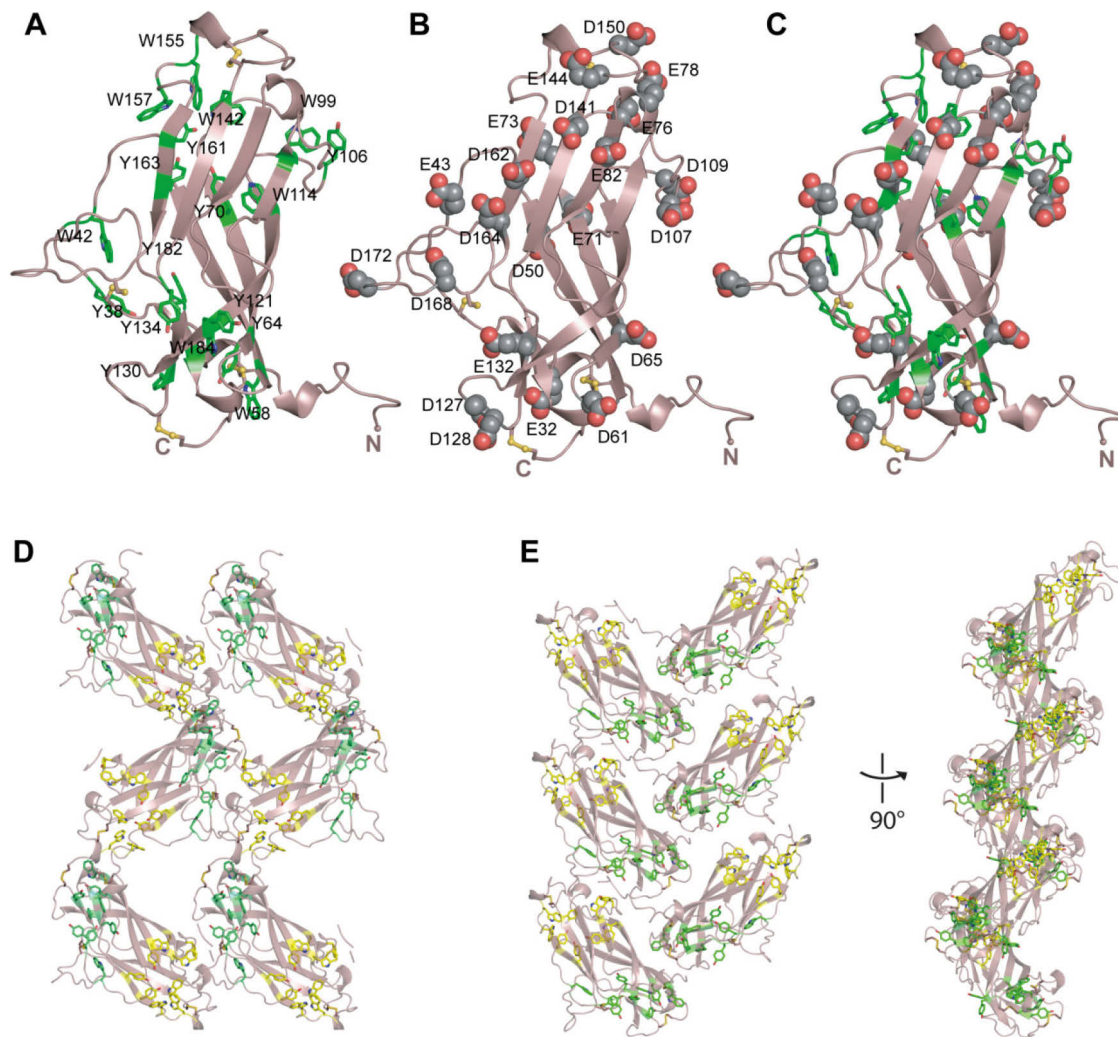
Die Neck subdomain wird durch drei Disulfidbrücken mit der FN3 Kernstruktur verbunden. Diese werden von den Cysteinpaaren C37/C167, C129/C192 und C28/C188 gebildet. Eine weitere Disulfidbrücke befindet sich in der Apical region und wird von den Cysteinresten C143 und C152 gebildet.



#### 4.5.5 Die funktionalen Elemente von *KpFlo11A1*

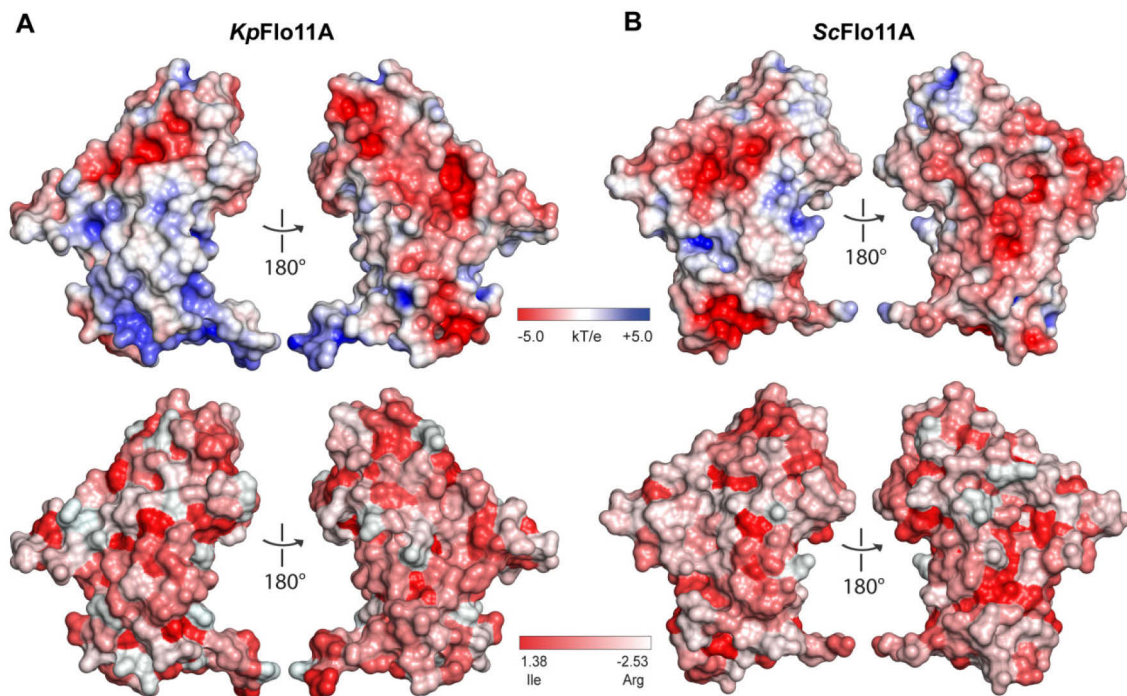
Ein charakteristisches Kennzeichen der Flo11A Domäne aus *S. cerevisiae* ist der hohe Grad an Solvens-exponierten aromatischen und sauren Resten, die für die homophile Interaktion verantwortlich sind. Die Analyse der Kristallstruktur von *KpFlo11A1* zeigt ein analoges Gruppieren der aromatischen und sauren Reste (Abbildung 54). Hier sind 6 von 8 Tryptophanen und 9 von 10 Tyrosinen oberflächenexponiert und gruppieren in zwei Bändern. *KpFlo11A1* besitzt einen sauren theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,51 und analog zur Verteilung der aromatischen Reste oberflächenexponierte saure Reste. Diese bestehen aus 9 Glutamat-Resten und 13 Aspartat-Resten. Die Oberflächenverteilung zeigt, dass diese mit den aromatischen Resten zusammenfallen.

In der Rekonstruktion der Kristallpackung von *KpFlo11A1* (Abbildung 54D und E) zeigt sich, dass die beiden aromatischen Bänder miteinander interagieren und Kristallkontakte ausbilden. Trotz zwei verschiedener Kristallformen werden in beiden Packungen Kristallkontakte über aromatische Reste ausgebildet.



**Abbildung 54 Strukturelle Eigenschaften der KpFlo11A1 Domäne.** (A) Kristallstruktur mit hervorgehobenen aromatischen Resten (Trp und Tyr). (B) Kristallstruktur mit hervorgehobenen sauren Resten (Glu und Asp). (C) Die Kristallstruktur von KpFlo11A1 zeigt, dass die aromatischen Reste von Bändern aus sauren Resten umgeben sind. (D) Rekonstruktion der Kristallpackung von KpFlo11A1 mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit und mit zwei Molekülen (E). Die aromatischen Reste im unteren Band sind in grün dargestellt, während die Reste des oberen Bandes in gelb dargestellt sind.

In Abbildung 55 sind die Oberflächeneigenschaften von KpFlo11A1 im Vergleich mit ScFlo11A dargestellt. Die Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials zeigt die generellen sauren Eigenschaften von KpFlo11A1 und ScFlo11A. Dabei zeigen sich vor allem auf Höhe des oberen aromatischen Bandes Bereiche mit negativ geladenen Resten (Abbildung 55A). Die Kolorierung der Oberfläche nach der Hydrophobizität hebt den hydrophoben Charakter von KpFlo11A1 und ScFlo11A hervor.



**Abbildung 55** Oberflächeneigenschaften von *KpFlo11A1* im Vergleich mit *ScFlo11A1*. (A) Analyse des elektrostatischen Oberflächenpotentials, die die sauren Eigenschaften von *KpFlo11A1* und *ScFlo11A1* zeigt. Die Berechnung erfolgte mit APBS<sup>191</sup>. (B) Analyse der Hydrophobizität nach der Eisenberg-Skala<sup>220</sup>.

#### 4.5.6 Kontaktwinkelmessungen mit *KpFlo11A1* und *ScFlo11A*

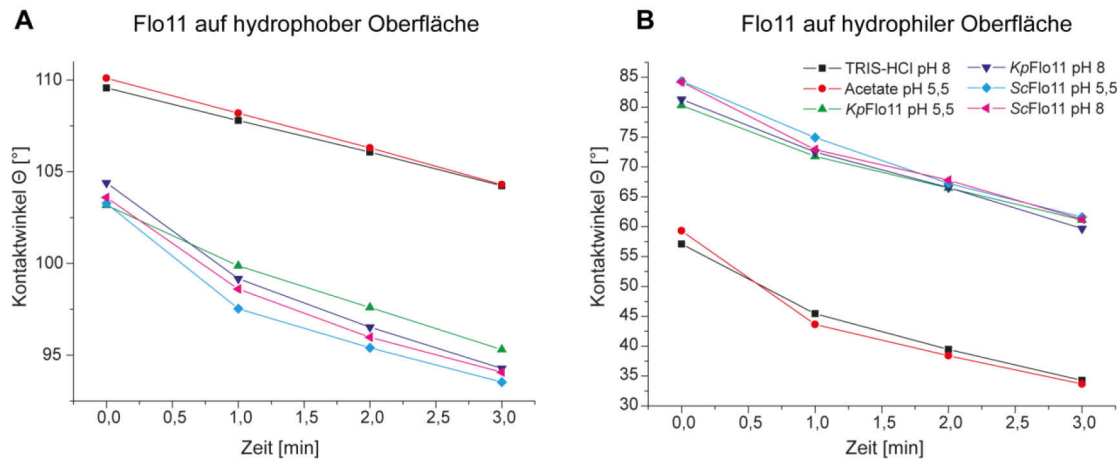
Die Analyse der Kristallstrukturen von *ScFlo11A* und *KpFlo11A1* ergab, dass beide Strukturen über eine Oberfläche mit einzelnen, hydrophoben Punkten verfügen. Um die hydrophoben Eigenschaften der aufgereinigten Proteine in Lösung näher zu charakterisieren wurden mit beiden Flo11A Domänen bei verschiedenen pH-Werten Kontaktwinkelmessungen durchgeführt.

Der Kontaktwinkel  $\theta$  bezeichnet den Winkel, den ein Tropfen auf einer Oberfläche zu dieser bildet. Gemessen wird dabei der Winkel im Inneren des Tropfens.

Die Größe des Winkels zwischen Flüssigkeit und Oberfläche hängt von der Wechselwirkung zwischen den Stoffen an der Berührungsfläche ab. Je geringer die Wechselwirkung, desto größer der Winkel  $\theta$  und umgekehrt.

Es wurden zwei beschichtete Goldoberflächen hergestellt. Um die hydrophobe Oberfläche herzustellen wurde ein mit Gold beschichtetes Glasplättchen in 1 mM Hexadecanthiol in n-Heptan inkubiert. Zur Herstellung der hydrophilen Oberfläche wurde das Glasplättchen in 1 mM Mercaptoundecansäure in Ethanol in-

kubiert. Anschließend wurden 5 mg/mL Proteinlösung in einem Tris-HCl Puffer (pH 8) und einem Acetatpuffer (pH 5,5) mit einem Volumen von 1  $\mu$ L auf die entsprechenden Oberflächen aufgebracht.



**Abbildung 56** Kontaktwinkelmessungen von *KpFlo11A1* und *ScFlo11A* auf hydrophober (A) und hydrophiler Oberfläche (B). Die Konzentration von *KpFlo11A1* und *ScFlo11A* betrug 0,5 mg/mL in einem Volumen von 1  $\mu$ L. Der Winkel  $\theta$  wurde über drei Minuten in einem Abstand von einer Minute gemessen. Durch Verdunstung werden die Winkel generell über die Zeit kleiner. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt und der Mittelwert dargestellt. Die Standardabweichung wurde der Übersicht halber nicht in die Darstellung mitaufgenommen.

Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen sind in Abbildung 56 dargestellt. Auf der hydrophoben Oberfläche bilden beide Flo11A Domänen einen Anfangswinkel von 102 bis 105°, während die beiden Puffer einen Winkel von 110° bilden. Somit ist die Wechselwirkung der beiden Proteine mit der hydrophoben Oberfläche größer im Vergleich mit den jeweiligen Puffern. Über die Zeit verdunsten die Flüssigkeiten, wodurch sich die gemessenen Winkel unabhängig von der Oberfläche verringern. Auf der hydrophilen Oberfläche ist die Situation umgekehrt. Die beiden Proteine zeigen hier Anfangswinkel von 80 bis 85°, während für beide Puffer deutlich kleinere Winkel von 58 bis 60° beobachtet werden. Somit ist die Wechselwirkung von *KpFlo11A1* und *ScFlo11A* mit der hydrophilen Oberfläche geringer im Vergleich mit den reinen Puffern. Die unterschiedlichen Puffer scheinen keinen Einfluss auf die Kontaktwinkel der Proteine zu haben.

Dieses Experiment zeigt, dass die Flo11A Domänen eine größere Affinität zu hydrophoben als zu hydrophilen Oberflächen haben. Damit scheint die in Sekti-

on 2.5.6 analysierte Oberflächenhydrophobizität mit den Eigenschaften der Proteine in Lösung zu korrelieren.

#### 4.5.7 Bindungsstudien der *KpFlo11A1*-Interaktion

Die Struktur von *KpFlo11A1* zeigte ein strukturelles Arrangement mit zwei Bändern von aromatischen Aminosäuren, eingebettet in Streifen von sauren Resten. Da *ScFlo11A* über ähnliche Eigenschaften verfügt, sollte überprüft werden, ob bei *KpFlo11A1* ähnliche Interaktionseigenschaften wie bei *ScFlo11A* beobachtet werden können.

Dazu wurden analog zu *ScFlo11A* SPR-Messungen mit der *KpFlo11A1* Domäne durchgeführt. *KpFlo11A1* wurde über Amin-Kupplung kovalent auf einen CM5 Chip immobilisiert und als Analyt für eine homophile Interaktion verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 und Abbildung 57 dargestellt. Bei pH 5,5 konnte eine  $K_D$  von  $31,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$  für die *KpFlo11A1*-*KpFlo11A1* Interaktion bestimmt werden. Bei diesem pH-Wert ist *KpFlo11A1* nahezu ungeladen, was eine Interaktion über die aromatischen Reste Tryptophan und Tyrosin begünstigt. Diese Affinität ist in der gleichen Größenordnung wie die homophile *ScFlo11A*-*ScFlo11A* Interaktion ( $19,5 \pm 2,3 \mu\text{M}$ ). Puffer mit einem höheren pH resultierten in einem fast vollständigen Verlust der Bindung (Abbildung 57C). Die Abstoßung kann durch die sauren Reste erklärt werden, welche bei diesem pH eine negative Ladung tragen und eine Interaktion über die aromatischen Reste verhindern. In diesem Punkt gleicht *KpFlo11A1* *ScFlo11A*, da auch hier ein Verlust der Bindungskompetenz bei höherem pH-Wert beobachtet werden konnte.

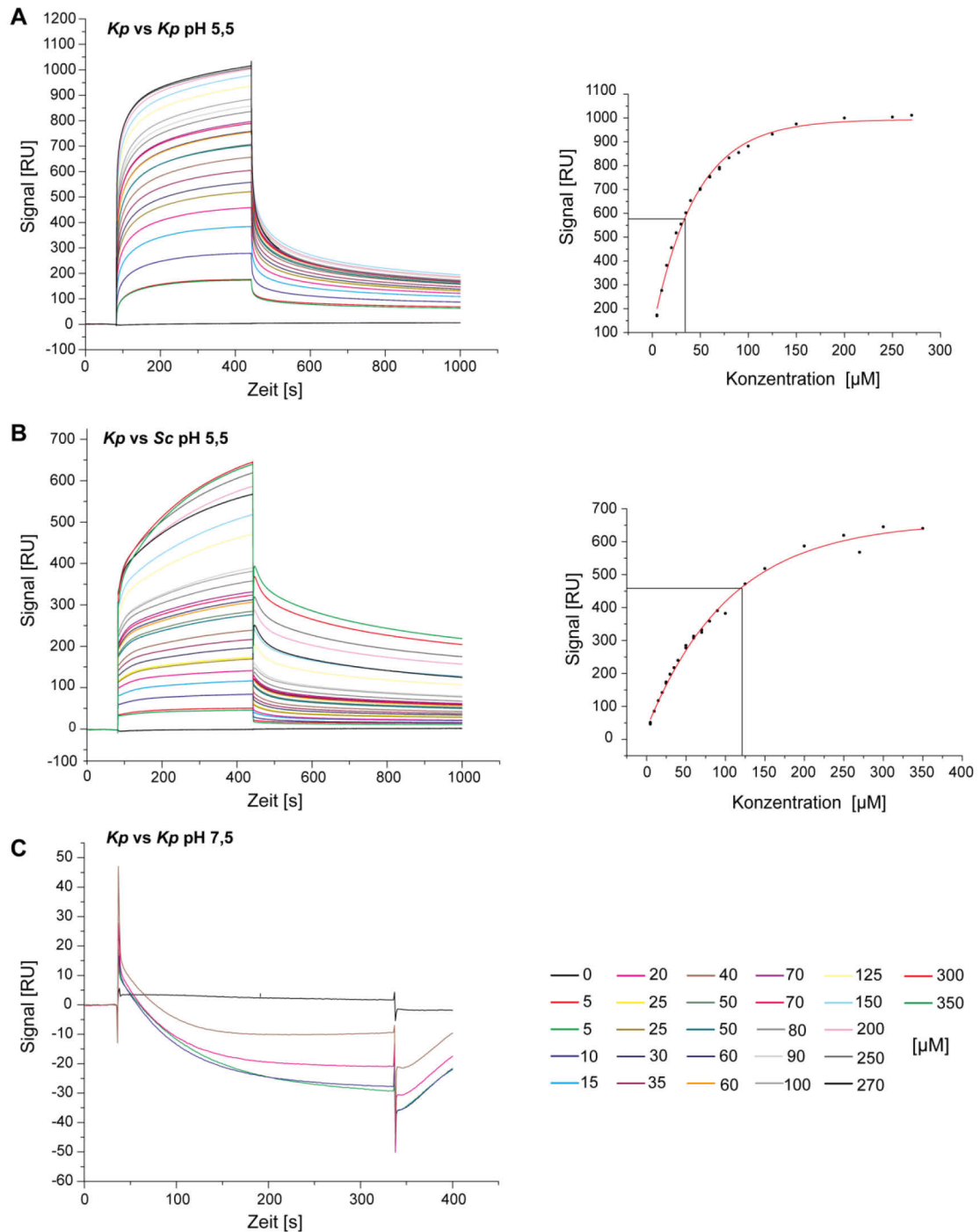
Beide Flo11A Domänen zeigen eine ähnliche, aber nicht identische, Gruppierung der aromatischen Reste. Daher wurde in einem zweiten Experiment die heterophile *KpFlo11A1*-*ScFlo11A* Interaktion untersucht. Dafür wurde *ScFlo11A* als Analyt in Lösung gehalten und *KpFlo11A1* auf dem CM5 Chip immobilisiert. Eine *ScFlo11A*-*KpFlo11A1* Interaktion konnte so nachgewiesen werden. Die heterophile *KpFlo11A1*-*ScFlo11A* Interaktionsstärke ist mit einer  $K_D$  von  $112,1 \pm 9,3 \mu\text{M}$  allerdings deutlich reduziert gegenüber den homophilen *ScFlo11A*-*ScFlo11A* und *KpFlo11A1*-*KpFlo11A1* Interaktionen.

**Tabelle 35** Ergebnisse und Statistiken aus der SPR Analyse der ScFlo11A-ScFlo11A, KpFlo11A1-KpFlo11A1 und KpFlo11A1-ScFlo11A Interaktion. Die Berechnungen wurden mit der BIAEvaluierungssoftware durchgeführt.

Affinitäts-Analyse (steady-state Bindung 1:1)				
Ligand	Analyt	K <sub>D</sub> (μM)		
ScFlo11A	ScFlo11A	19,5 ± 2,3		
KpFlo11A1	KpFlo11A1	31,8 ± 1,1		
KpFlo11A1	ScFlo11A	121,1 ± 9,3		
Kinetische Analyse (1:1 Bindungsmodell)				
Ligand	Analyt	K <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)
ScFlo11A	ScFlo11A	414,0	10,6E-4	2,6E-6
KpFlo11A1	KpFlo11A1	178,3	15,5E-4	8,7E-6
KpFlo11A1	ScFlo11A	11,8	9,3E-4	7,9E-5

Um zu überprüfen, ob die heterophile Interaktion bei der Komplexbildung oder der Dissoziation beeinträchtigt wird, wurde eine kinetische Analyse auf Grundlage der SPR Daten durchgeführt. So können die Assoziationskonstante ( $k_{on}$ ) und Dissoziationskonstante ( $k_{off}$ ) bestimmt werden. Diese sind in Tabelle 35 dargestellt. Interessanterweise sind die  $k_{off}$  Werte in der gleichen Größenordnung, sowohl für die homophilen, als auch die heterophilen Interaktionen. Die Assoziationskonstante ( $k_{on}$ ) hingegen ist für die heterophile KpFlo11A1-ScFlo11A Interaktion stark verringert im Vergleich zu den homophilen Interaktionen. Dies zeigt, dass vor allem die Assoziation der zwei verschiedenen Flo11A Domänen betroffen ist.

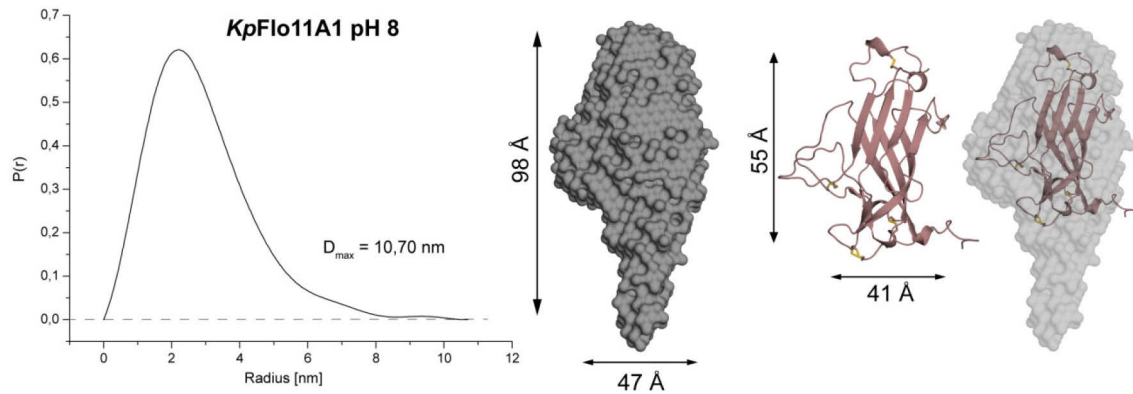




**Abbildung 57** SPR Bindungsanalyse der *KpFlo11A1-KpFlo11A1* und *KpFlo11A1-ScFlo11A* Interaktionen. (A) Sensorgramm der *KpFlo11A1-KpFlo11A1* Interaktion bei pH 5,5 mit konzentrationsabhängigem Fit (rechts). *KpFlo11A1* wurde immobilisiert und als Analyt in Lösung von 5 bis 270  $\mu\text{M}$  eingesetzt. (B) Sensorgramm der *KpFlo11A1-ScFlo11A* Interaktion bei pH 5,5 mit konzentrationsabhängigem Fit (rechts). *KpFlo11A1* wurde immobilisiert und *ScFlo11A* als Analyt von 5 bis 350  $\mu\text{M}$  eingesetzt. (C) Sensorgramm der *KpFlo11A1-KpFlo11A1* Interaktion bei pH 7,5. Rechts sind die eingesetzten Analyt-Konzentrationen zu sehen.

#### 4.5.8 SAXS Analyse von KpFlo11A1

Um die strukturellen Eigenschaften der KpFlo11A1 Domäne in Lösung zu analysieren wurden SAXS Experimente in verschiedenen Konzentrationen bei pH 8 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 58 dargestellt.



**Abbildung 58** SAXS Experimente von KpFlo11A1 bei pH 8. Der Konzentrationsbereich lag bei 1-14 mg/mL. Die *pair-distribution function* wurde mit Hilfe von GNOM berechnet<sup>214</sup>.  $D_{\max}$  wurde durch Autognom bestimmt. Die Berechnung der Hülle erfolgte mit DAMMIF<sup>199</sup>. Die Strukturen von KpFlo11A1 wurden manuell in die Hüllen eingepasst.

Die *Pair-distribution function* zeigt einen  $D_{\max}$  von 10,70 nm für die KpFlo11A1 Domäne bei pH 8 an. Die Abmessungen der Kristallstruktur zeigen eine Fläche von  $41 \times 55 \text{ Å}^2$  für diese Flo11A Domäne. Hier ist die stabähnliche Verlängerung der SAXS Struktur nicht zugerechnet. KpFlo11A1 zeigt eine ähnliche strukturelle Form in Lösung wie die ScFlo11A Domäne, was sehr gut mit der Form der Kristallstruktur korreliert. Im Anhang befinden sich die Streukurven, *Guinier Plots* und *Kratky Plots*.

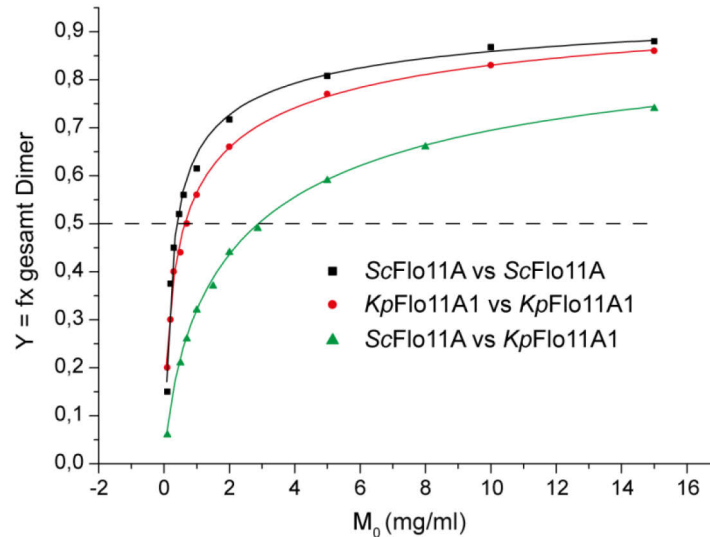
#### 4.5.9 Untersuchungen zur Dimerbildung der Flo11A Domäne

Die Flo11A Domänen aus *S. cerevisiae* und *K. pastoris* zeigten ein homotypisches Bindungsverhalten bei pH 5,5. Bei diesem pH sind beide Domänen nahezu ungeladen, sodass von einer Interaktion über die aromatischen Reste ausgegangen wird.

Durch die Biacore Analysen konnte eine Flo11A-Flo11A Interaktion bei pH 5,5 mit einer  $K_D$  von 20  $\mu\text{M}$  für die ScFlo11A-ScFlo11A bzw. 30  $\mu\text{M}$  für KpFlo11A1-KpFlo11A1 bestimmt werden. Das heißt, bei Konzentrationen von 20  $\mu\text{M}$  (0,46 mg/ml für ScFlo11A) und 30  $\mu\text{M}$  (0,66 mg/mL für KpFlo11A1) sollten die



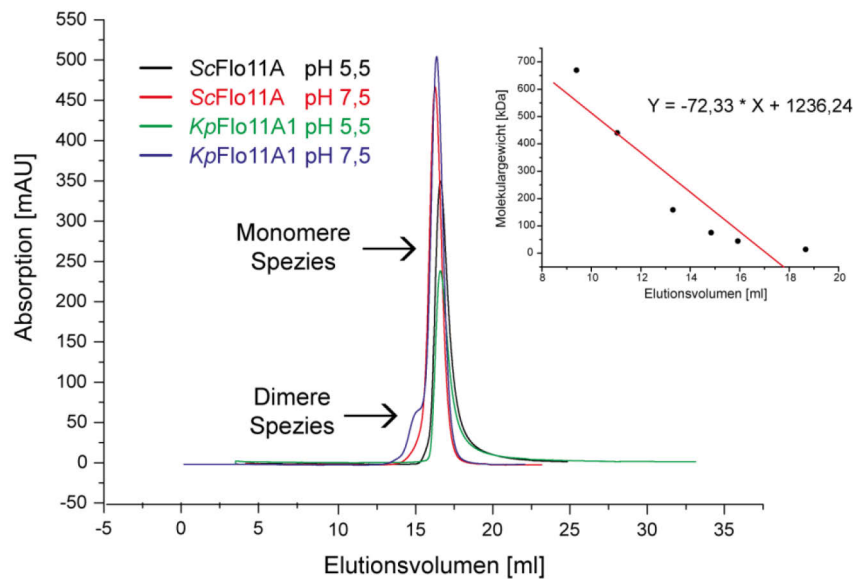
A-Domänen zu 50 % als dimere Spezies vorliegen. Mit Hilfe der im Methoden-Abschnitt 3.3.5 beschriebenen Formeln kann anhand der  $K_D$  die Anzahl an theoretisch gebildeten dimeren Spezies bei jeder Proteinkonzentration  $M_0$  berechnet werden (Abbildung 59).



**Abbildung 59** Anteil an theoretisch möglichem Dimer für die einzelnen Flo11A-Flo11A Interaktionen. Ausgehend von der  $K_D$  (= 50 % Dimer) kann durch Einsetzen einer Proteinkonzentration  $M_0$  in die Formeln (1) und (2) der Anteil an Dimer berechnet werden. Die gestrichelte Linie zeigt die Höhe der  $K_D$  bei 50 % an.

Die beiden homotypischen Interaktionen (ScFlo11A-ScFlo11A und KpFlo11A1-KpFlo11A1) einen ähnlichen kurvenverlauf, da auch beide eine ähnliche  $K_D$  aufweisen. Die heterotypische ScFlo11A-KpFlo11A1 Interaktion hingegen zeigt eine flachere Kurve, da die  $K_D$  hier auch deutlich größer ist. Aus diesen Berechnungen geht hervor, dass bei Konzentrationen über 2 mg/mL bei pH 5,5 sowohl ScFlo11A, als auch KpFlo11A1 zum Großteil als dimere Spezies in Lösung vorliegen sollten.

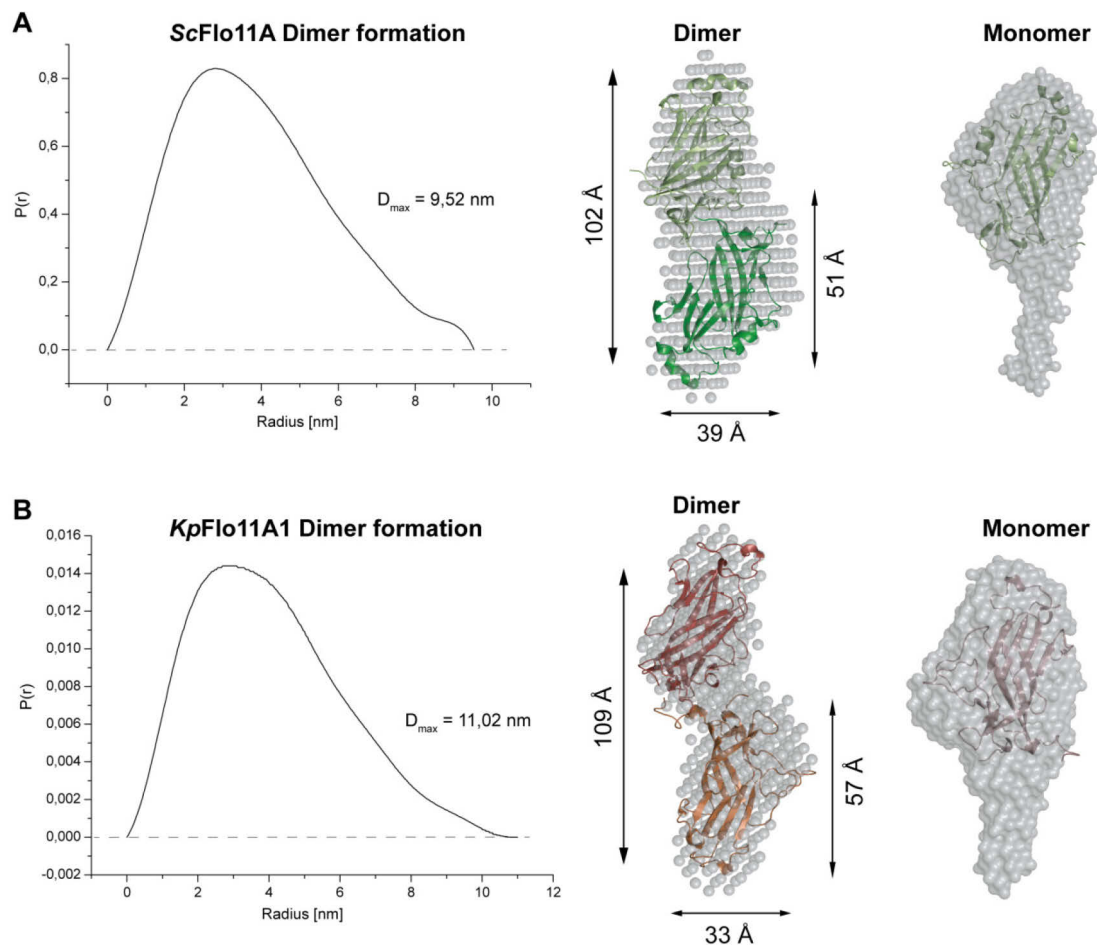
Um die Dimerbildung in Lösung näher zu untersuchen, wurden die monomeren Spezies der aufgereinigten Flo11A Domänen weiter mittels analytischer Größenausschlusschromatographie untersucht (Abbildung 60).



**Abbildung 60** Analytische Gelfiltration der Flo11A Domänen aus *S. cerevisiae* (ScFlo11A) und *K. pastoris* (KpFlo11A1) bei verschiedenen pH-Werten. Die aufgetragene Proteinkonzentration betrug 5 mg/mL bei einem Volumen von 100  $\mu$ L mit einer Superdex 200 10/300 GL bei 7  $^{\circ}$ C. Die Kalibrierung der Säule ist als Einschub oben rechts gezeigt. Zwei verschiedene Puffer (20 mM Acetat/Essigsäure pH 5,5 und 20 mM HEPES pH 7,5) wurden als Laufpuffer verwendet. KpFlo11A1 zeigt bei pH 7,5 eine kleine Schulter, die der dimeren Spezies zugeordnet werden konnte

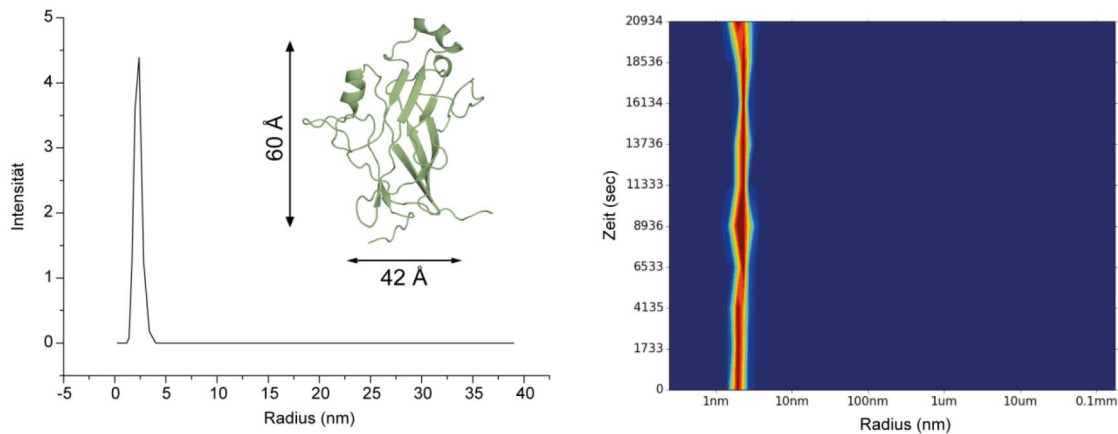
Beide Flo11A Domänen eluieren fast ausschließlich als monomere Spezies. Lediglich KpFlo11A1 zeigt bei pH 7,5 eine kleine dimere Schulter auf Höhe des Dimers. Bei diesem pH sollten die Domänen aber negative Ladungen auf der Oberfläche tragen und keine physiologisch relevante Interaktion zeigen. Möglicherweise handelt es sich hier um polare oder elektrostatische Interaktionen.

Dennoch wurden die dimeren Fraktionen ankonzentriert und für SAXS Experimente genutzt. Für ScFlo11A konnten in der präparativen Größenausschlusschromatographie auch kleinere dimere Fraktionen erhalten werden, die ebenfalls für eine SAXS Analyse genutzt werden konnten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 61 dargestellt. Die *pair-distribution function* zeigt einen  $D_{\max}$  von 9,53 nm für ScFlo11A und 11,02 nm für KpFlo11A. Die anschließende Modellierung wurde mit dem *Dammif* in der Symmetrie P2 durchgeführt. Die modellierte Form entspricht der Größe der dimeren Spezies.



**Abbildung 61 SAXS Analyse der dimeren Spezies von ScFlo11A und KpFlo11A1.** Die Fraktionen wurden aus den präparativen Gelfiltrationen gewonnen (Abbildung 16 für ScFlo11A und Abbildung 48 für KpFlo11A1). Die Konzentrationen lagen zwischen 1 und 5 mg/mL. Die *pair-distribution function* wurde mit Hilfe von GNOM berechnet<sup>214</sup>.  $D_{\max}$  wurde durch *Autognom* bestimmt. Die Berechnung der Hülle erfolgte mit DAMMIF<sup>199</sup>. Die Strukturen von KpFlo11A1 und ScFlo11A wurden manuell in die Hüllen eingepasst.

Die SAXS Experimente der dimeren Spezies legen den Schluss nahe, dass es sich bei den dimeren Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie nicht um eine physiologische relevante Dimerbildung handelt, sondern um zwei Flo11A Domänen, die möglicherweise über falsch geknüpfte Disulfidbrücken in der *Apical region* verbunden sind. Im Anhang befinden sich die Streukurven, *Guinier Plots* und *Kratky Plots*.



**Abbildung 62** *Dynamic Light Scattering* der monomeren Spezies von ScFlo11A bei pH 5,5. Links ist der Durchschnitt der Partikelverteilung gezeigt mit der Kristallstruktur von ScFlo11A als Einschub. Rechts die zeitliche Entwicklung der Partikelverteilung. Die Konzentration von ScFlo11A betrug 10 mg/mL. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob sich bei pH 5,5 dimere Spezies bilden können, wurde eine Lösung von 10 mg/mL ScFlo11A in Acetatpuffer pH 5,5 mittels *Dynamic Light Scattering* (DLS) untersucht. Mit Hilfe von DLS kann die Größe und Größenverteilung von Molekülen und Partikeln in einer Lösung untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 62 dargestellt. Der durchschnittliche hydrodynamische Radius der Proteinlösung zeigt einen Peak, der zur Größe der monomeren Spezies passt. Der zeitliche Verlauf zeigt ebenfalls die Stabilität des Monomers über einen Zeitraum von mehr als 5 Stunden.

Auch unter den Bedingungen von pH 5,5 scheinen sich demnach keine messbaren dimeren Spezies in Lösung zu bilden, die auch physiologisch relevant sind. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass es kein genau definiertes Interaktions-Interface einer 1:1 Flo11A-Flo11A Bindung gibt.

## 4.6 Die Flo11A Domänen *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A*

In *Komagataella pastoris* finden sich neben *KpFlo11-1* noch zwei weitere Vertreter aus der Flo11 Familie. Diese wurden analog zu *KpFlo11-1* als *KpFlo11-2* und *KpFlo11-3* bezeichnet. Beide Proteine verfügen über eine einzelne N-terminale Flo11A Domäne, die jeweils eine sehr hohe Sequenzidentität von 93 % zueinander aufweisen (Abbildung 63). Zu *KpFlo11-A1* zeigen beide Domänen nur jeweils eine Sequenzidentität von 66 %.

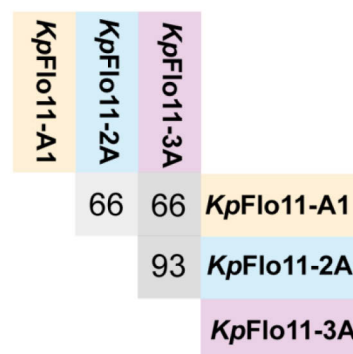
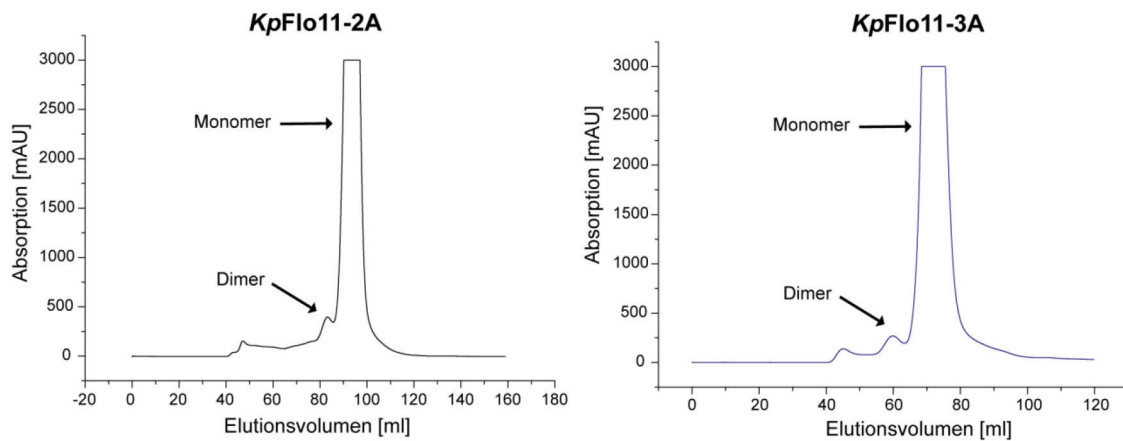


Abbildung 63 Sequenzidentitäten von Flo11A Domänen aus *Komagataella pastoris*. Die Angaben beziehen sich auf die prozentuale Sequenzidentität und wurden mittels Clustal Omega berechnet.

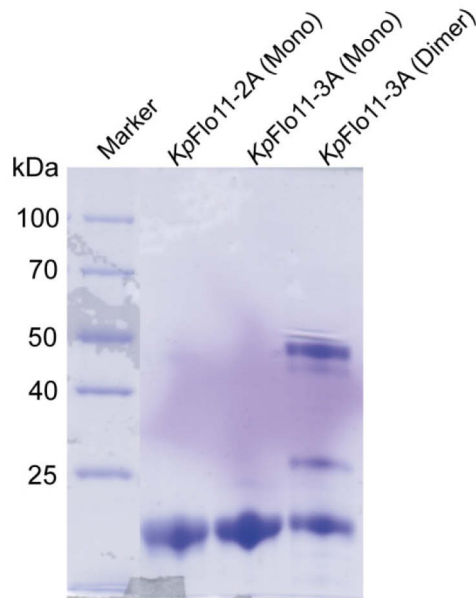
### 4.6.1 Produktion von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A*

Die Gensequenzen von *KPFLO11-2A* und *KPFLO11-3A* wurden in den Expressionsvektor pET28a mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag kloniert. Die Expression erfolgte analog zu *KpFlo11A1* in *E. coli* T7 Shuffle Express mit 0,05 mM IPTG als Induktion. Die Ausbeute lag mit 12-15 mg/mL im vergleichbaren Rahmen zu den anderen Flo11A Domänen. Die präparative Größenausschlusschromatographie nach der NiNTA zeigt, dass saubere, monomere Proben von beiden Flo11A Domänen erhalten werden konnten (Abbildung 64).



**Abbildung 64 Präparative Größenausschlusschromatographie von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A*.** *KpFlo11-2A* wurde mit einer Superdex 200 16/60 aufgereinigt, *KpFlo11-3A* mit einer Superdex 75 16/60. Als Laufpuffer wurde 20 mM HEPES, pH 7,50 mM NaCl verwendet.

Die Fraktionen auf Höhe des Monomers und die Fraktionen des Dimers wurden ankonzentriert und mittels reduzierender SDS-PAGE auf Reinheit und Größe untersucht (Abbildung 65). Das theoretische Molekulargewicht beträgt für beide Flo11A Domänen 21 kDa und diese konnten auch als saubere, monomere Fraktionen erhalten werden. Die dimere Spezies von *KpFlo11-3A* wurde ebenfalls auf das Gel aufgetragen und läuft auf der Höhe der erwarteten Größe des Dimers (ca. 42 kDa).



**Abbildung 65 SDS PAGE von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* nach präparativer Größenausschlusschromatographie.**

Die dimeren Fraktionen von *KpFlo11-3A* scheinen auch unter den Bedingungen einer reduzierenden SDS-PAGE stabil zu sein, obwohl in den Fraktionen auch Banden auf Höhe der monomeren Spezies vorhanden sind.

#### 4.6.2 CD Spektroskopie von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A*

Eine erste strukturelle Untersuchung wurde mittels CD Spektroskopie bei verschiedenen pH-Werten vorgenommen. *KpFlo11-2A* denaturiert bei pH 5 irreversibel, weshalb alle Messungen lediglich bei pH 6, 7 und 8 durchgeführt werden konnten. Beide Flo11A Domänen zeigen im FernUV pH-unabhängige Spektren mit hohen  $\beta$ -Faltblattanteilen. Der charakteristische Peak bei 230 nm von *KpFlo11A1* ist hier allerdings weniger stark ausgeprägt. Die Faltungsstabilität scheint bei beiden Domänen bei pH 7 am größten zu sein. *KpFlo11-2A* besitzt hier einen Schmelzpunkt ( $T_m$ ) von 62 °C und *KpFlo11-3A* von 57 °C. Bei pH 6 und 8 zeigt *KpFlo11-2A* einen  $T_m$  von 45 bzw. 55 °C. *KpFlo11-3A* zeigt einen  $T_m$  von 46 °C für pH 5 und 51 °C bei pH 6 und 8. Eine Rückfaltung konnte nicht beobachtet werden, auch wenn es hier Anzeichen von *molten globule state* gibt.

*KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* zeigen ein sehr ähnliches Bild bei der CD Spektroskopie, das sich aber in Hinsicht auf Faltungsstabilität und den weniger ausgeprägten Peak bei 230 nm vom *KpFlo11A1* unterscheidet (Abbildung 66). Die Faltungsstabilitäten von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* (62 bzw. 57 °C bei pH 7) ähneln sogar eher dem  $T_m$  der *KpFlo11A1* Variante mit reduzierten Disulfidbrücken durch Anwesenheit von DTT (56 °C).

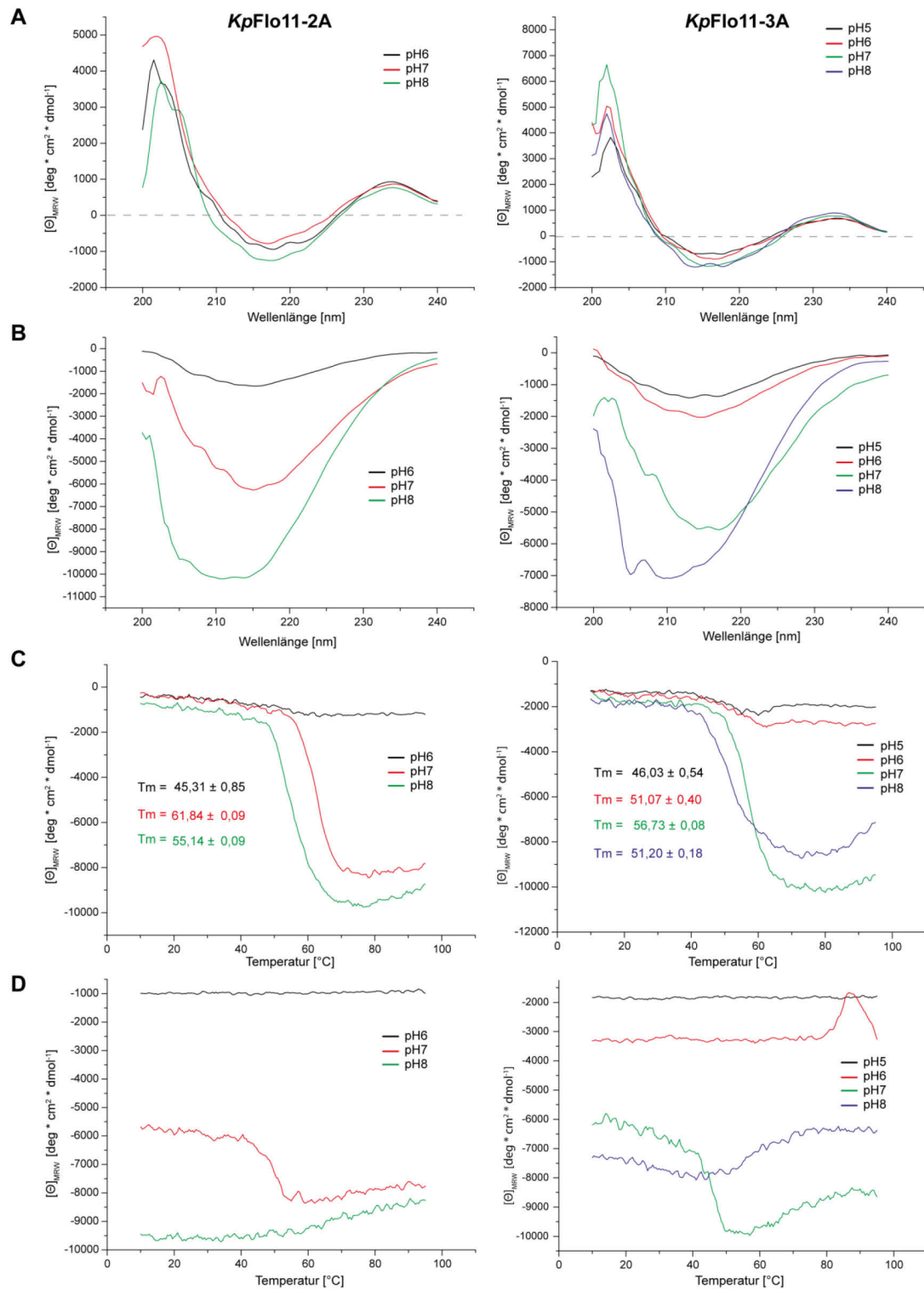


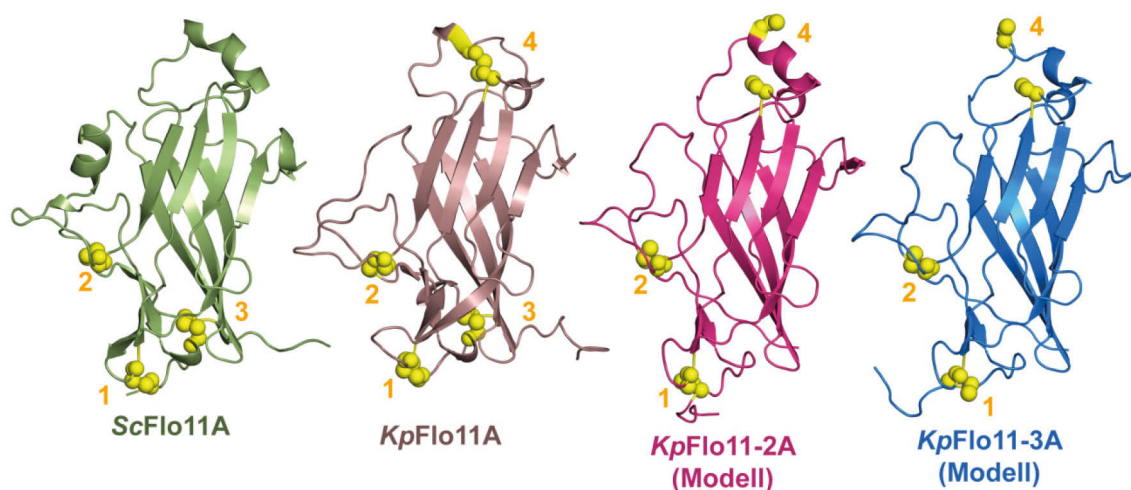
Abbildung 66 CD Spektroskopie von *KpFlo11-2A* (linke Reihe) und *KpFlo11-3A* (rechte Reihe) im Vergleich. (A) FernUV CD Spektroskopie. (B) FernUV CD Spektroskopie nach Hitzedenaturierung. (C) Schmelzpunktanalyse bei 215 nm. (D) Rückläufiger Temperaturscan nach Hitzedenaturierung.



#### 4.6.3 Kristallisation von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A*

*KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* zeigten ihre größten Faltungsstabilitäten bei pH 7. Daher wurden beide Domänen für die Kristallisation in 20 mM HEPES, pH 7, 50 mM NaCl eluiert. Die Konzentration für *KpFlo11-2A* betrug 46 mg/mL und 49 mg/mL für *KpFlo11-3A*. Zum Einsatz kamen die *sparse matrix screens* AmSO<sub>4</sub>, Anions, Classics, Classics Lite, Cryos, JCSG+, JCSG Core I, JCSG Core II, JCSG Core III, JCSG Core IV, MBC I, MBC II, PACT, und JB Penta bei 4 °C und 18 °C.

Für beide Flo11A Domänen konnten keine Kristalle unter den oben genannten Bedingungen erhalten werden. Daher wurde eine Modellierung der Primärsequenzen mit Hilfe des Programms *MODELLER* und der Kristallstruktur von ScFlo11A als Templat durchgeführt (Abbildung 67).



**Abbildung 67** Homologiemodelle von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* im Vergleich mit den Kristallstrukturen von ScFlo11A und *KpFlo11A1*. Die Modellierung von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* wurde mit dem Programm *MODELLER* und der Kristallstruktur von ScFlo11A als Templat durchgeführt. Die Positionen der Cysteine bzw. Disulfidbrücken sind von 1 bis 4 nummeriert.

Die Modelle von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* zeigen, dass die FN3 Domäne den Modellen zufolge auch hier konserviert ist. Das Vorhandensein von Disulfidbrücken scheint sich bei allen vier Flo11A Domänen zu unterscheiden. Durch einen strukturellen Vergleich konnten vier Positionen von Disulfidbrücken identifiziert werden (Abbildung 67). Die Disulfidbrücken 1-3 sind in ScFlo11A und *KpFlo11A1* konserviert, während *KpFlo11A1* noch eine weiter auf Position 4 besitzt. Bei *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* scheinen die Positionen 1, 2 und 4 vorhanden zu sein, während hier die dritte zu fehlen scheint. Das Fehlen dieser

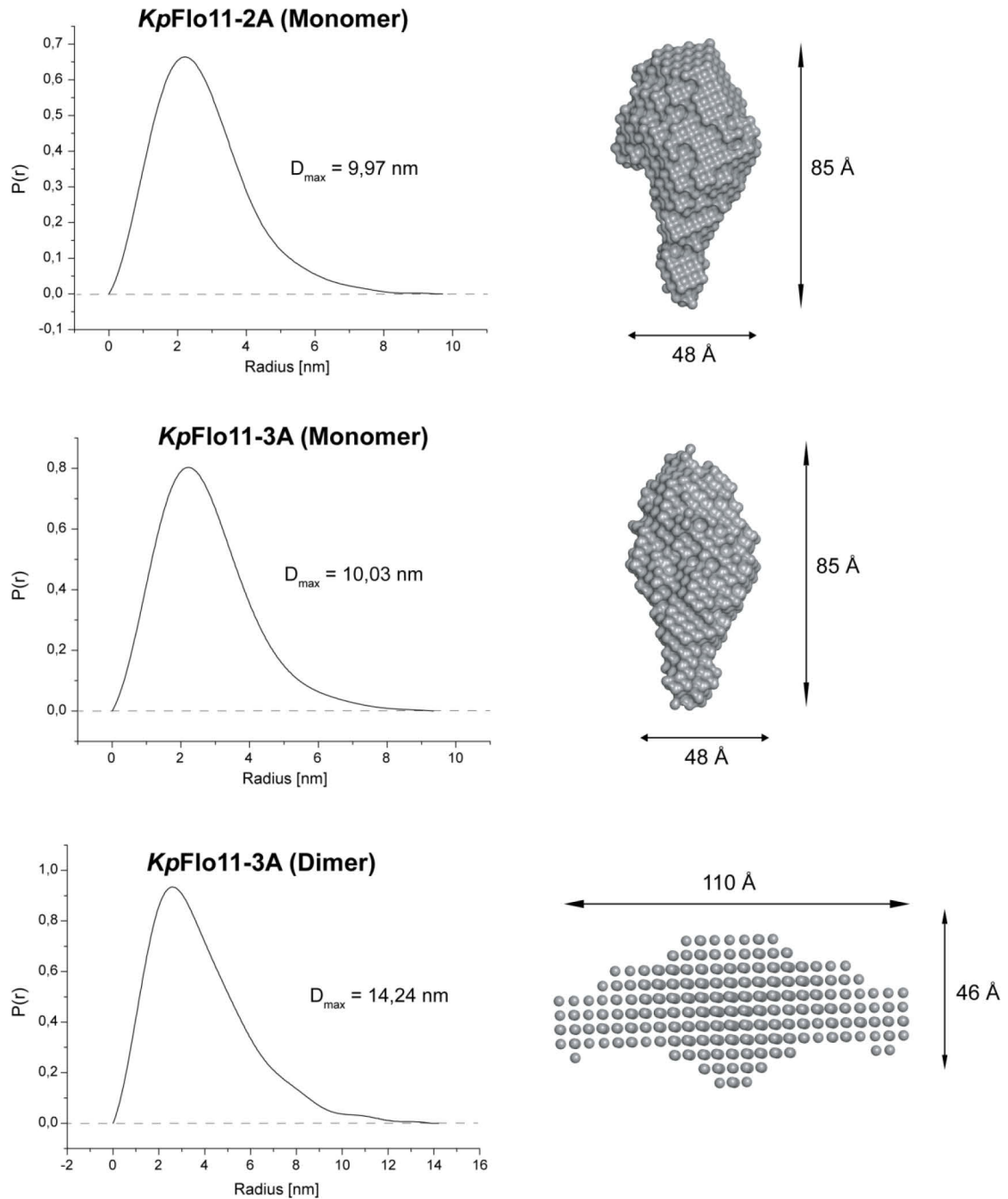
Disulfidbrücke könnte zu der niedrigeren Faltungstabilität beitragen im Vergleich zu den Flo11A Domänen ScFlo11A und KpFlo11A1.

### 4.6.4 SAXS Analyse von KpFlo11-2A und KpFlo11-3A

Um das Verhalten der beiden Flo11A Domänen in Lösung zu analysieren wurden mit den ausgereinigten Proteinen SAXS Analysen durchgeführt. Dabei wurden monomere Spezies von KpFlo11-2A und KpFlo11-3A und dimere Spezies von KpFlo11-3A untersucht. Die *pair-distribution function* und die Modellierung der entsprechenden Hüllen sind in Abbildung 68 dargestellt.

Die *pair-distribution function* ergab für KpFlo11-2A einen  $D_{\max}$  von 9,97 nm und für KpFlo11-3A 10,03 nm. Die Werte wurden über die Funktion *Autognom* berechnet. Die modellierten Hüllen (Symmetrie P1) zeigen ähnliche Formen, wie für ScFlo11A und KpFlo11A, sodass zusammen mit den Homologiemodellen davon ausgegangen werden kann, dass diese tatsächlich auch eine ähnliche Struktur aufweisen. Die modellierten Strukturen wurden nicht in die Hüllen eingepasst, da es sich lediglich um Homologiemodelle handelt.

Die *pair-distribution function* für die ankonzentrierten dimeren Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie für KpFlo11-3A ergab einen  $D_{\max}$  von 14,24 nm durch Autognom. Die modellierte Hülle (Symmetrie P2) zeigt eine ähnliche Form wie die dimeren Spezies für ScFlo11A und KpFlo11A1. Die Fraktion war zudem unter den Bedingungen einer reduzierenden SDS PAGE teilweise stabil und wurden bei pH 7 erhalten (fernab des pI). Dies deutet darauf hin, dass die dimeren Flo11A Spezies, die durch die präparative Größenausschlusschromatographie erhalten wurden, keine physiologische Relevanz haben. Möglicherweise sind sie durch falsch geknüpfte Disulfidbrüchen in der *Apical region* entstanden. Im Anhang befinden sich die Streukurven, *Guinier Plots* und *Kratky Plots*.



**Abbildung 68** SAXS Analyse von KpFlo11-2A und KpFlo11-3A. Die Konzentrationen für KpFlo11-2A (monomer) lagen zwischen 1 bis 17 mg/mL, für KpFlo11-3A (Monomer) zwischen 0,8 bis 12 mg/mL und für KpFlo11-3A (Dimer) bei 1,5 bis 4,6 mg/mL. Die *pair-distribution function* wurde mit Hilfe von GNOM berechnet<sup>214</sup>.  $D_{\max}$  wurde durch Autognom bestimmt. Die Berechnung der Hülle erfolgte mit DAMMIF<sup>199</sup>.

## 5 Diskussion

Hefen bestehen aus einer Gruppe ca. 1500 taxonomisch und phylogenetisch nicht miteinander verwandter Pilze, die in der Lage sind, vegetativ als einzellige Organismen zu wachsen. In Hefen vermittelt eine Familie GPI-verankerter Zellwandproteine (Adhäsine/Flokkuline) spezifische Adhäsion an zelluläre und nicht-zelluläre Oberflächen. In dieser Arbeit wurden Adhäsine aus zwei Vertretern der Familie der Saccharomycetaceae untersucht, nämlich der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der methylo trophen Hefe *Komagataella pastoris*. Die Flokkuline von *S. cerevisiae* können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste beinhaltet Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10, die terminale Mannosereste auf der Zelloberfläche erkennen und dadurch Flockenbildung vermitteln können. Die N-terminale Bindedomäne dieser Lektine besteht aus einer PA14 Domäne und beinhaltet ein Calcium-Bindemotiv, wo zwei Aspartat-Reste durch eine *cis*-Peptidbindung verknüpft sind, um ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion zu koordinieren. Die zweite Gruppe wird durch Flo11 repräsentiert, welches an der Ausbildung verschiedener Arten multizellulärer Strukturen wie Biofilmen, Flors oder Filamente beteiligt ist. Die N-terminale Bindedomäne von Flo11 zeigt keinerlei Homologie zu der PA14 Domäne und repräsentiert eine eigene Pfam Familie (PF10182).

Die methylo trophe Hefe *K. pastoris* ist ein in der Biotechnologie weitverbreiteter Organismus zur Proteinproduktion. Der Lebensstil und die Entwicklung von Phänotypen wie Biofilme oder Flocken ist in *K. pastoris* allerdings weitaus weniger gut erforscht.

In dieser Arbeit wurde die Flo11A Domäne aus den *S. cerevisiae* Stämmen S288C und  $\Sigma$ 1278b auf ihre strukturellen und adhäsiven Eigenschaften untersucht.

In *K. pastoris* wurden ebenfalls Flo5- und Flo11-artige Orthologe identifiziert. Diese besitzen allerdings nur eine geringe Sequenzidentität von 30 % zu ihren Pendants in *S. cerevisiae*. Drei Zellwandproteine des Flo11-Typs aus *K. pastoris* wurden hier untersucht und ihre Eigenschaften mit denen aus *S. cerevisiae* verglichen.

## 5.1 Die Struktur der Flo11A Domäne

Die ScFlo11A Struktur zeigte eine globuläre, keilförmige Domäne mit einem komplexen Faltungsmotiv aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern. Dabei formen die  $\beta$ -Faltblätter I und II die Fibronectin Typ III (FN3) Domäne. Die Gesamtgröße der Flo11A Domäne mit  $54 \times 48 \times 23 \text{ \AA}^3$  ist vergleichbar mit den PA14-artigen A-Domänen von Flo5 aus *S. cerevisiae* oder Epa1 aus *Candida glabrata*. Die Topologien der PA14 Domäne und der FN3 Domäne sind aber gänzlich verschieden (Abbildung 69).

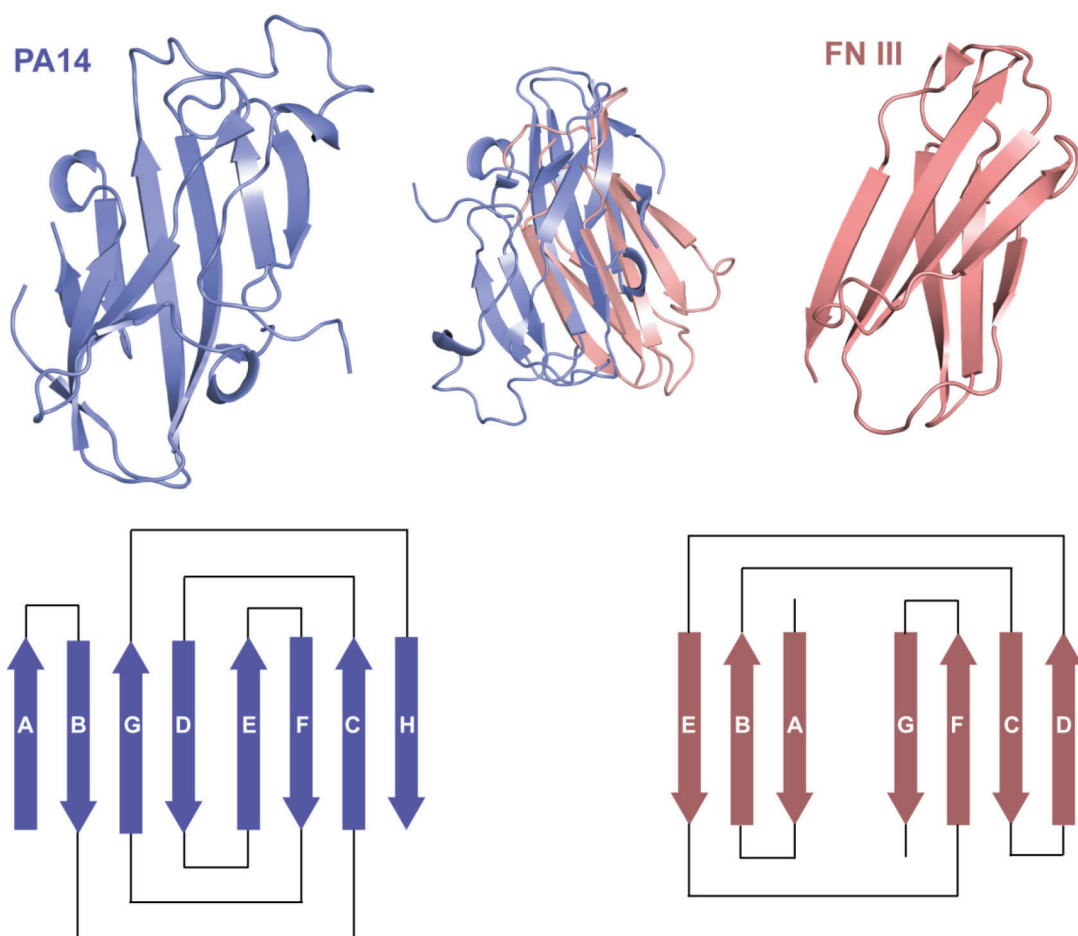


Abbildung 69 Topologie der PA14 Domäne (blau) im Vergleich mit der Topologie der FN III Domäne (rosa). Die PA14 Domäne aus *Bacillus anthracis* (PDB code: 1ACC) ist in blau dargestellt (links). Die FN III Domäne (*Homo sapiens*) ist in rot dargestellt (rechts). In der Mitte ist eine strukturelle Überlagerung gezeigt zwischen der PA14 Domäne und der FN III Domäne mit einem *root-mean-square deviation* von  $11,35 \text{ \AA}$  für 87  $C_\alpha$  Atome. Die PA14 Domäne zeigt einen  $\beta$ -Sandwich mit einer *jelly-roll* Topologie im Vergleich mit der Topologie der FN III Domäne (unten).

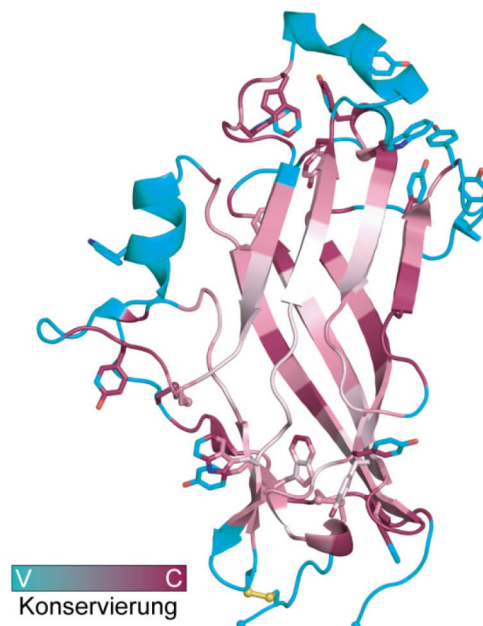
Die PA14 Domäne ist die erste Domäne des *protective antigen* (PA) aus *Bacillus anthracis*, welches aus insgesamt vier Domänen aufgebaut ist. Durch proteolytische Spaltung an einem Loop in Domäne 1 wird diese freigesetzt und spielt für die Wirkung des Toxins keine weitere Rolle mehr<sup>221, 222</sup>. Die PA14 Domäne besteht aus einem  $\beta$ -Sandwich mit einer *jelly-roll-artige* Topologie und kleineren  $\alpha$ -helikalen Anteilen<sup>223</sup>. Die FN III Domäne besteht ebenfalls aus einem  $\beta$ -sandwich, der aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern gebildet wird<sup>224</sup>. Beide Domänen zeigen allerdings keine Homologie zueinander, was sich in dem *r.m.s.d.* von 11,35 Å über 87 C $\alpha$  Atome widerspiegelt (Abbildung 69).

Die Fibronectin Typ III Domäne selbst ist der Namensgeber einer großen Subfamilie (FN III Familie oder s-Typ Immunoglobulin Familie) der Immunoglobulin Superfamilie. Zur FN III Familie gehören Zelladhäsionsproteine, Zelloberflächenhormone, Zytokinrezeptoren, Kohlenhydratbindedomänen, usw.<sup>225-227</sup>. Diese Proteine sind alle an der Erkennung und spezifischen Bindung an andere Moleküle beteiligt<sup>206</sup>. Dabei werden die Erkennungsstellen für den Liganden von den Oberflächenloops geformt, was die FN III Domäne zu einem effektiven Gerüst macht, auf das Loops zur spezifischen Ligandenerkennung gebaut werden können<sup>228, 229</sup>. Dies zeigt sich auch in der Kristallstruktur von ScFlo11A. Die aromatischen Reste, die für eine homotypische Bindung verantwortlich sind, befinden sich hauptsächlich in der *Apical region*, welche zum Großteil aus Loop-Elementen besteht.

In mehreren Studien wurden die Oberflächen-Loops von verschiedenen FN III Domänen untereinander getauscht, wodurch sich deren thermische Stabilität nicht geändert hat<sup>230-232</sup>. Dies zeigt, dass die FN III Domäne beträchtliche Veränderungen in der Sequenz der Loop Regionen tolerieren kann<sup>233</sup>. Die in dieser Arbeit behandelten Flo11A Strukturen von ScFlo11A,  $\Sigma$ Flo11A und KpFlo11A1 haben alle eine Fibronectin Typ III Domäne als Kernstruktur und unterscheiden sich hauptsächlich durch die Struktur der Loop-Regionen. Das Homologiemodell von  $\Sigma$ Flo11A zeigt, dass sogar eine Insertion von 15 Aminosäuren in den Loop-Regionen möglich ist. Diese Beobachtungen stützen die These, dass sich die FN III Domäne als ein mögliches Target für *protein engineering* eignet. Durch Variation bzw. Austausch der Loop-Regionen können so stabile Proteine entwickelt werden, welche mit hoher Affinität an Zielproteine binden<sup>234-236</sup>.

Trotz sehr unterschiedlicher Sequenzen und biologischer Funktionen finden sich FN III Domänen in vielen tierischen und bakteriellen Proteinen. ScFlo11A ist allerdings das erste strukturelle Beispiel einer FN III Domäne in Pilzen, die Adhäsion vermittelt. FN III Domänen wurden in Pilzen zunächst nur durch *hidden Markov models* vorhergesagt, u.a. bei dem *cargo adaptor protein* Chs5 aus *S. cerevisiae* und einer  $\gamma$ -Untereinheit des translationalen Elongationsfaktors Yef3<sup>237, 238</sup>. In dem strukturell charakterisierten cytosolischen Chs5 *cargo adaptor* vermittelt die FN III Domäne Protein-Protein Interaktionen durch Rekrutieren der GTPase Arf1.

Um die Konservierung der kritischen Reste innerhalb der Flo11A Familie zu untersuchen, wurde in Abbildung 27 (Abschnitt 4.2.4) ein multiples Sequenz Alignment (MSA) mit Sequenzen durchgeführt, die maximal 50 % Sequenzidentität zu ScFlo11A aufweisen, durchgeführt. Mit Hilfe des *consurf* Servers wurde dieses Alignment über die Struktur von ScFlo11A gelegt (Abbildung 70).



**Abbildung 70** Analyse der konservierten Reste der ScFlo11A Struktur. Mit Hilfe des *consurf* servers<sup>239, 240</sup> wurde das in Abbildung 27 dargestellte Multiple Sequenz Alignment (MSA) auf die Kristallstruktur von ScFlo11A gelegt. Die höher konservierten Bereiche sind in rosa, die weniger konservierten in cyan dargestellt.

Die *consurf* Analyse zeigt, dass die FN III Domäne sehr gut konserviert ist, während die apikalen Loop-Regionen im Gegensatz dazu weniger gut konserviert sind. Dies ist ein weiterer Beleg für die hohe Variabilität der Loop-Regionen der



FN III-basierten Flo11A Domänen. Diese können je nach Funktion für unterschiedliche Aufgaben angepasst werden.

Die FN III Domäne ist eine der wenigen Mitglieder der Immunoglobulin Superfamilie, die selbst keine Disulfidbrücken besitzt. Allerdings sind in den Kristallstrukturen von ScFlo11A und KpFlo11A1 die N und C Termini durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert. Diese Fixierung der Kernstruktur der Flo11A Domänen ähnelt den sonst strukturell nicht-verwandten ScFlo5 und CgEpa1 Adhäsinen. Dort wurde die Fixierung der N und C Termini als Barriere gegen die freie Rotation der A-Domäne relativ zur B Region gesehen. So kann eine stabile Präsentation der A-Domäne auf der Zelloberfläche gewährleistet werden. In den Strukturen von ScFlo11A und KpFlo11A1 findet sich eine dritte konservierte Disulfidbrücke, die die *Neck region* mit der FN III Domäne verbindet und damit der Gesamtstruktur eine größere Stabilität verleiht.

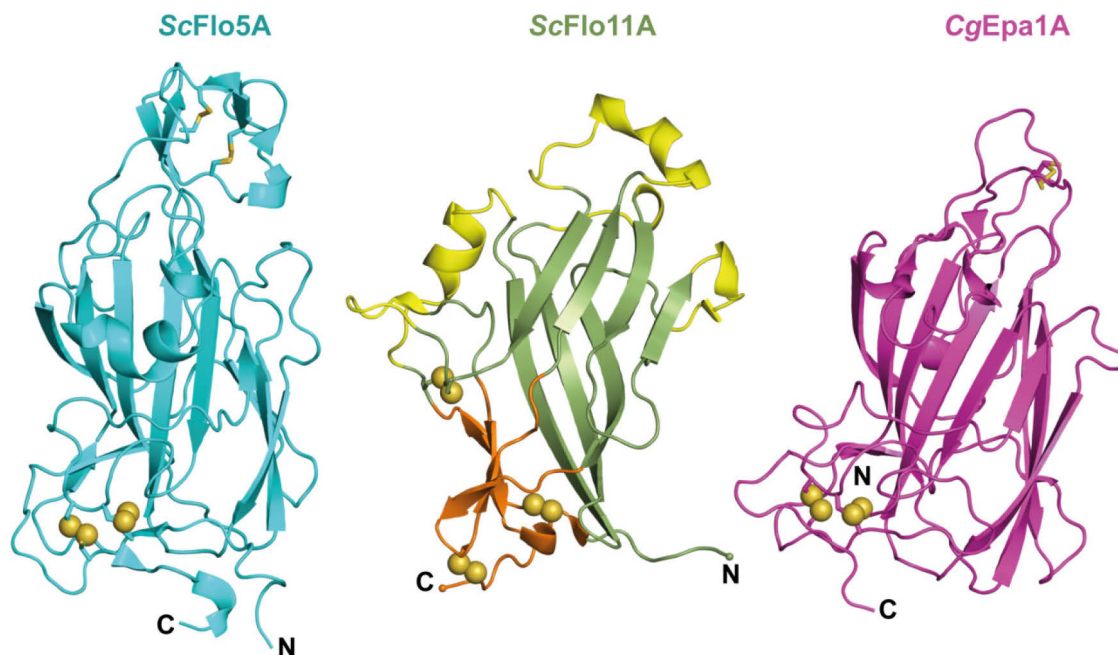


Abbildung 71 Vergleich der *Neck* Regionen von ScFlo5A, ScFlo11A (*S. cerevisiae*) und CgEpa1A (*C. glabrata*). Die für diese Region relevanten Disulfidbrücken sind als Kugeln hervorgehoben. Die Neck Region bildet den Übergang zur B-Domäne.

Die *Neck region* bildet den Übergang zur B-Domäne. In Abbildung 71 sind die Kristallstrukturen von ScFlo11A und KpFlo11A1 den Homologiemodellen von KpFlo11-2A und KpFlo11-3A gegenübergestellt. Bei allen Flo11A Strukturen besteht diese aus einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt. Bei den Modellen von



*KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* zeigt sich allerdings, dass die N- und C-Termini lediglich durch eine Disulfidbrücke stabilisiert sind. Auf diese Weise könnte eine etwas flexiblere und weniger rigide Präsentation der A-Domäne möglich sein.

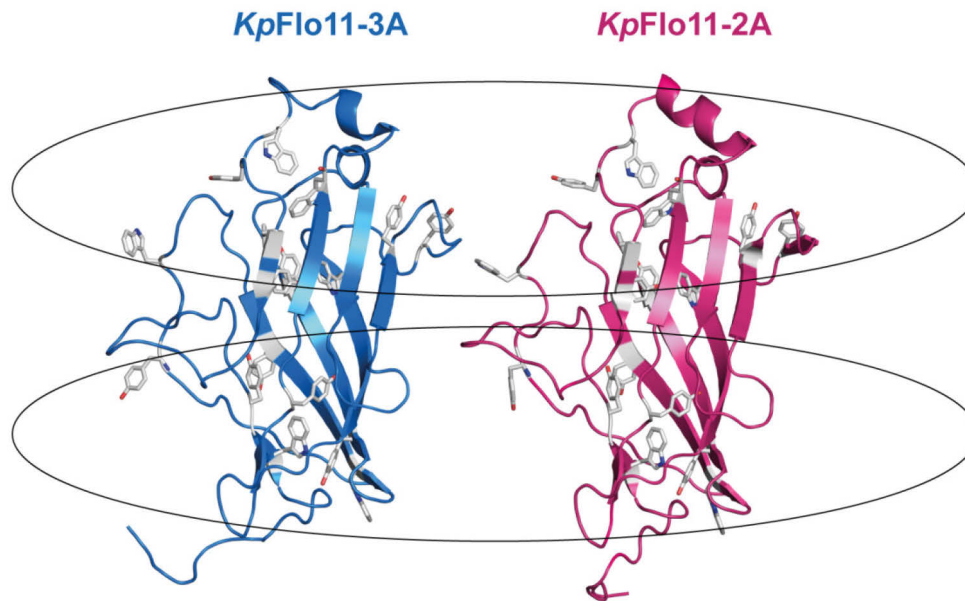
## 5.2 Die funktionellen Elemente von Flo11A

Flo11 ist an der Ausbildung vieler verschiedener Phänotypen beteiligt. Dazu zählen multizelluläre Strukturen wie Biofilme, Flors oder Filamente. So unterschiedlich diese auch in der Erscheinung sind, haben sie dennoch alle entweder Zell-Zell oder Zell-Oberflächen Adhäsion als gemeinsames, verbindendes Element.

### 5.2.1 Die aromatischen Reste

Die Kristallstruktur der Flo11A Domäne zeigte keine Bindestelle für (kleinere) Liganden wie das z.B. bei den Lektinen Epa1A und Flo5A der Fall ist. Stattdessen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Flo11A homotypische Interaktionen über oberflächenexponierte aromatische Reste vermittelt. Bereits frühere Studien legten eine homophile Flo11-Flo11 Interaktion nahe<sup>85</sup>. In einer Studie wurde ein kleines, hydrophobes und basisches Oligopeptid, PAF26 (RKKWFW), als Verstärker für die Bildung von Biofilmen gefunden<sup>241</sup>. Dieses sollte als „Brücke“ zwischen den Zellen fungieren. Die Kristallstruktur von Flo11A würde diese Hypothese insofern stützen, dass die homotypische Flo11A-Flo11A Interaktion ebenfalls über aromatische Reste (Typtophan und Tyrosin) abläuft und so eine Verstärkung durch die aromatischen Reste WFW möglich wäre.

Die Reste, die die aromatischen Bänder in der Struktur von Flo11A bilden, sind innerhalb der Flo11 Proteinfamilie gut konserviert, sodass von einer funktionellen Rolle ausgegangen werden kann. Diese finden sich auch an den korrespondierenden Positionen in den Homologiemodellen von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* (Abbildung 72).



**Abbildung 72** Homologiemodelle von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* mit hervorgehobenen aromatischen Resten Tryptophan und Tyrosin (grau). Die Ellipsen zeigen die Position der Aromatischen Bänder.

Dennoch ist es wahrscheinlich, dass nicht ein einziger Rest innerhalb der aromatischen Bänder, sondern vielmehr die darauf gegründete Hydrophobizität, kritisch für eine adhäsive Funktion der Flo11A Domänen ist. Die Oberflächenbänder, bestehend aus Tryptophanen und Tyrosinen, erhöhen die Hydrophobizität der Zelloberfläche, wodurch eine Interaktion mit hydrophoben Oberflächen möglich wird. Trotz der exponierten Lage der aromatischen Reste, scheinen diese Reste hochgeordnet, wie die Kristallstrukturen zeigen. Die CD Spektroskopie Messungen der verschiedenen Flo11A Domänen in Lösung zeigten um den Bereich bei 230 nm einen auffälligen Peak, welcher kennzeichnend für die Anwesenheit von aromatischen Resten ist<sup>242, 243</sup>. Mutagenese-Studien an dem Protein Barnase, einer von *Bacillus amyloiquefaciens* sekretierten Ribonuklease, haben gezeigt, dass Tryptophan für positive und negative CD Signale bei 231 nm verantwortlich ist<sup>244</sup>. Wenn diese Erkenntnisse auf die CD Spektroskopie von Flo11A übertragen werden, so ist es wahrscheinlich, dass der Peak in der Region um 230 nm von den aromatischen Resten (Tryptophan und Tyrosin) statt der Disulfidbrücken verursacht werden.

Mutagenese-Studien an den aromatischen Resten von ScFlo11A haben einen Tripel-Tyrosin-Cluster (Y111, Y113, Y118) identifiziert, welcher für die homotypische Flo11A-Flo11A Interaktion kritisch ist. Der Austausch einzelner Reste in

den aromatischen Bändern führte hingegen zu fast keinem Effekt. Diese Daten haben gezeigt, dass kollektiven Eigenschaften des aromatischen Clusters in Band I entscheidend für die Flo11A-Flo11A Interaktionen sind. Werden einzelne Reste ausgetauscht, beeinflusst das die Gesamt-Hydrophobizität nur gering und kann möglicherweise durch die verbliebenen Reste kompensiert werden.

### 5.2.2 Die sauren Reste

Die aromatischen Reste in der Struktur von Flo11A sind eingebettet in Gruppen von sauren Resten, welche hauptsächlich aus Aspartat und Glutamat bestehen. Die sauren Reste sind wahrscheinlich für die ausgeprägte pH-Abhängigkeit der Flo11A Domäne verantwortlich, was sich zunächst in unterschiedlichen Faltungsstabilitäten in der CD Spektroskopie bei den verschiedenen pH-Werten zeigte (Tabelle 36).

**Tabelle 36** Faltungsstabilitäten aus der CD Spektroskopie der Flo11A Domänen bei verschiedenen pH-Werten. Die Zahlenwerte sind in °C. Die jeweiligen Standardabweichungen sind den entsprechenden Kapiteln aus dem Ergebnis-Teil zu entnehmen.

pH	ScFlo11A	KpFlo11A1	KpFlo11-2A	KpFlo11-3A
5	76,4	79,9	-	46,0
6	76,1	86,0	45,3	51,1
7	69,1	83,7	61,8	56,7
8	65,1	80,9	55,1	51,2

Aus der Tabelle 36 ist ersichtlich, dass sich die Schmelzpunkte für die unterschiedlichen Flo11A Domänen bei verschiedenen pH-Werten stark voneinander abweichen, womit eine pH-abhängige Faltungsstabilität resultiert.

Die Einbettung der aromatischen Reste in saure Reste sorgt möglicherweise für die sehr hohe Löslichkeit der Flo11A Domäne von mehr als 100 mg/mL. In der Flo11A Domäne kommt dieses Co-Clustern von aromatischen Resten mit sauren Resten natürlich vor. Die Einführung einer hohen Dichte saurer Reste auf Proteinoberflächen ist aber auch eine Methode des *Protein engineering* und wird dort als „*Supercharging*“ bezeichnet<sup>245</sup>. Dadurch kann die Löslichkeit erhöht und zugleich Aggregation und Denaturierung verhindert werden. So konnten die Löslichkeit und Resistenz gegenüber Denaturierung bei Antikörper-

Fragmenten durch Einführung von zwei bis drei sauren Resten in der Nähe von hydrophoben Resten deutlich gesteigert werden<sup>246</sup>.

Auf diese Weise könnte die sehr hohe Löslichkeit der Flo11A Domäne die Fähigkeit widerspiegeln, bei hohem pH auf der Zelloberfläche trotz oberflächenexponierter aromatischer Reste vereinzelt vorzuliegen und bei niedrigem pH homotypische Interaktionen zu forcieren.

### 5.2.3 Flo11A: Ein membrangebundenes Hydrophobin?

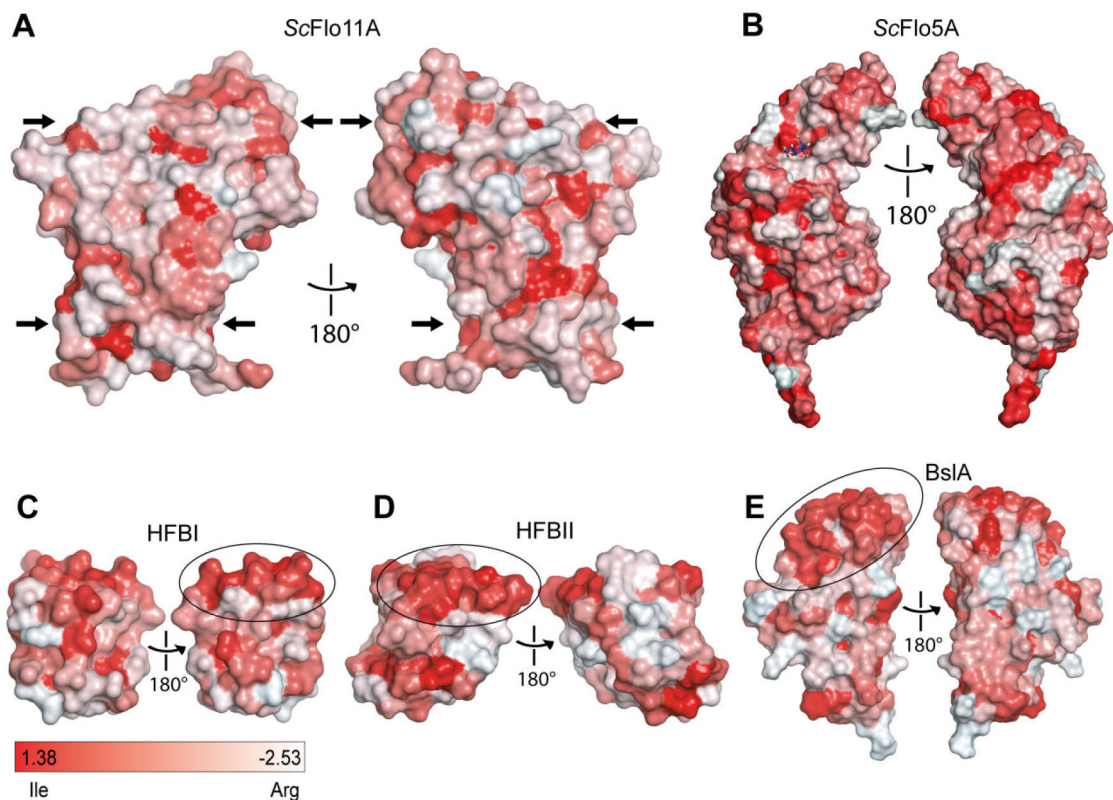
Die Flo11A Domäne verfügt über eine Reihe an Charakteristika, die sich auch bei einer bestimmten Klasse von Proteinen finden, die fast ausschließlich in filamentösen Pilzen gefunden werden, den Hydrophobinen<sup>31</sup>.

Vor allem die exponierten aromatischen Reste von ScFlo11A legen diesen Vergleich nahe. Hydrophobine stellen eine Klasse von oberflächenaktiven Proteinen dar, die von filamentösen Pilzen produziert werden. Sie besitzen sowohl einen hydrophilen als auch hydrophoben Teil, wodurch sie amphiphile Eigenschaften besitzen<sup>30</sup>. So können sich Hydrophobine an hydrophoben/hydrophilen Grenzflächen wie z.B. der Luft-Wasser-Grenzfläche anlagern, indem der hydrophobe Teil in den hydrophoben Bereich und der hydrophile Teil in den hydrophilen Bereich ragen<sup>247</sup>. Daher besteht die Hauptfunktion der Hydrophobine in ihrer Fähigkeit der Interaktion mit Oberflächen und der Herabsetzung der Oberflächenspannung, sodass z.B. Hyphen die Luft-Wasser Grenzschicht durchbrechen können<sup>32</sup>.

Die Struktur der Hydrophobine wird durch vier Disulfidbrücken stabilisiert, möglicherweise um den destabilisierenden Effekt der exponierten hydrophoben Reste zu kompensieren<sup>248-250</sup>. Die Struktur von ScFlo11A wird wie die Hydrophobine durch Disulfidbrücken stabilisiert. Die Analyse von ScFlo11A,  $\Sigma$ Flo11A, *Kp*Flo11A1, *Kp*Flo11-2A und *Kp*Flo11-3A zeigte aber, dass die Flo11A Domäne von drei oder vier Disulfidbrücken stabilisiert werden kann, während Hydrophobine stets von vier Disulfidbrücken stabilisiert werden<sup>31</sup>. Hydrophobine sind mit einer Größe von durchschnittlich 100 Aminosäuren auch nur halb so groß wie die hier untersuchten Flo11A Domänen (durchschnittlich 200 Aminosäuren).

Hydrophobine zeigen eine hohe Löslichkeit. So wurde z.B. für SC3 aus *Schizophyllum commune* und HFBI und HFBII aus *Trichoderma reesei* Konzentrationen von mehr als 100 mg/mL berichtet<sup>31, 248</sup>. Dabei zeigen Hydrophobine in Lösung ein typisches Verhalten für oberflächenaktive Proteine, indem sie konzentrationsabhängig verschiedene Formen von Aggregaten ausbilden. So können in Lösung Dimere oder Tetramere gebildet werden<sup>251, 252</sup>.

Trotz der Vielzahl an verfügbaren Genomdaten wurden in Hefen bisher keine Hydrophobine identifiziert. Möglicherweise sind sie für die Habitate von Hefen nicht notwendig<sup>249</sup>.



**Abbildung 73** Strukturen verschiedener Hydrophobine im Vergleich mit den Flo11A und Flo5A Domänen aus *S. cerevisiae*. Der Farbcode basiert auf der Hydrophobizitätsskala nach Eisenberg et al.<sup>220</sup>. Hydrophobe Elemente sind eingekreist. (A) ScFlo11A. Die Pfeile zeigen die Positionen der aromatischen Bänder. (B) ScFlo5A im Komplex mit Mannose (PDB code: 2XJP). (C) HFBI aus *Trichoderma reesei* (PDB code: 2GVM). (D) HFBII aus *Trichoderma reesei* (PDB code: 2B97). (E) BslA aus *Bacillus subtilis* (PDB code: 4BHU).

In Abbildung 73 findet sich ein Vergleich zwischen verschiedenen Hydrophobinen und den A-Domänen von Flo11 und Flo5 aus *S. cerevisiae*. Dabei zeigt sich bei den Hydrophobinen sehr deutlich ein Teil des Proteins, welcher einen

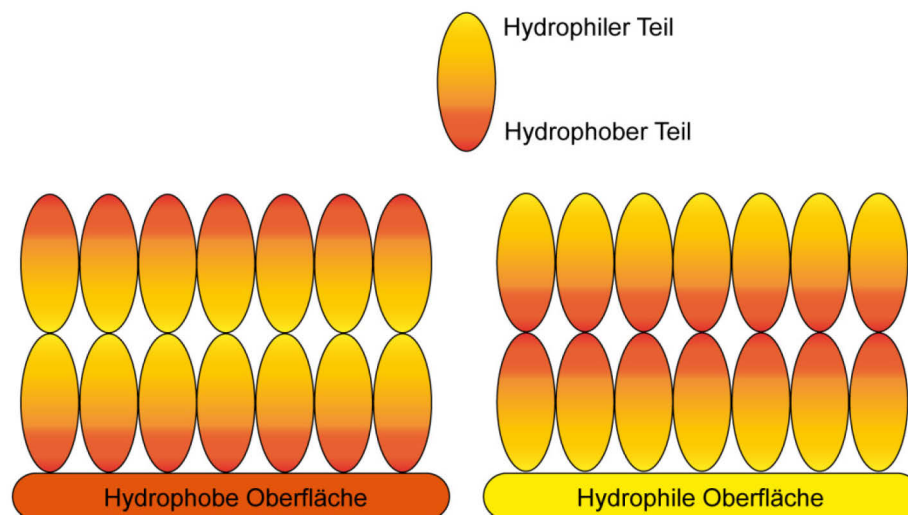
sehr starken hydrophoben Charakter aufweist. Bei den Hydrophobinen HFBI und HFB II macht diese Region bis zu 20 % der Gesamtoberfläche aus<sup>253</sup>. Die Struktur von ScFlo11A zeigt zwar auch einzelne hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche, allerdings keinen so ausgeprägten Bereich wie das bei den klassischen Hydrophobinen der Fall ist. Flo5A aus *S. cerevisiae*, als Beispiel eines C-Typ Lektins, zeigt interessanterweise auch solche hydrophoben Bereiche auf der Oberfläche.

Die Kristallstruktur von ScFlo11A zeigt, dass es Charakteristika aufweist, die auch in der Klasse der Hydrophobine gefunden werden. Dazu zählen z.B. die solvens-exponierten aromatischen Reste. Allerdings weisen die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, welche die aromatischen Bänder I und II charakterisieren, nach der Hydrophobizitätsskala von Eisenberg *et al.* nur einen Wert von 0,810 für Tryptophan und 0,260 für Tyrosin aus. Dem stehen die deutlich hydrophoberen Aminosäuren Isoleucin (1,380), Phenylalanin (1,190), Valin (1,080) und Leucin (1,060) gegenüber. Diese Reste kennzeichnen im Gegenzug aber die hydrophoben Cluster der Hydrophobine. Dennoch ist für Flo11 berichtet, dass es einen hydrophoben Charakter hat und zur Erhöhung der Hydrophobizität der Zelloberfläche beiträgt<sup>82, 85, 95</sup>. Möglicherweise ist die Skala nach Eisenberg *et al.* nicht ausreichend geeignet, die Hydrophobizität von Flo11A zu beschreiben. Trotz mangelnder Vergleichbarkeit der hydrophoben Oberflächeneigenschaften, gibt es Gemeinsamkeiten abseits der Hydrophobizitäts-Skala. So kommen Hydrophobine fast ausschließlich in filamentösen Pilzen vor und auch Flo11 ist ein entscheidender Faktor bei der Ausbildung von Pseudohyphen in *S. cerevisiae*<sup>102, 114, 254, 255</sup>.

In Hinblick auf Löslichkeit, Aggregation und Faltungsstabilität zeigen sich ebenfalls Übereinstimmungen zwischen der Flo11A Domäne und den Hydrophobinen. Für die Flo11A Domänen konnten, ähnlich wie für HFBI und HFBII, Konzentrationen von mehr als 100 mg/mL erreicht werden. Die Faltungsstabilitäten von KpFlo11A1 und ScFlo11A lagen pH-abhängig durchschnittlich bei 72 bis 83 °C. Hydrophobine zeigen eine teilweise noch höhere thermische Faltungsstabilität von bis zu 100 °C<sup>256</sup>. Die hohe thermische Stabilität der Flo11A Domäne kommt wahrscheinlich nicht ausschließlich von den drei bis vier Disulfidbrücken, da die ähnlich große ScFlo5A Domäne mit einer Schmelztemperatur von 35 °C

vergleichsweise instabil ist, obwohl sie vier Disulfidbrücken hat. Stattdessen könnten bei den Flo11A Domänen, wie bei den Hydrophobinen, die oberflächen-exponierten hydrophoben Reste eine wichtige Rolle für die hohe Stabilität spielen.

In Lösung zeigen Hydrophobine durch ihren amphiphilen Charakter eine Assemblierung wie sie für oberflächenaktive Proteine typisch ist (Abbildung 74). Der hydrophobe Teil interagiert dabei mit hydrophoben Oberflächen oder dem hydrophoben Teil des Proteins, während der hydrophile Teil mit hydrophilen Oberflächen oder dem hydrophilen Teil des Hydrophobins interagieren kann. So können sich aufgrund des hydrophoben Effekts mehrere solcher Schichten bilden.



**Abbildung 74** Schematische Darstellung der Zusammenlagerung von Hydrophobinen auf einer hydrophilen und einer hydrophoben Oberfläche. Der rote Bereich zeigt die exponierten hydrophoben Reste der Hydrophobine, während der gelbe Teil die hydrophile Seite zeigt.

Bei den Hydrophobinen ist diese Assemblierung konzentrations-, temperatur- und zum Teil auch pH-abhängig. So lagert sich HFBI bei hohen Proteinkonzentrationen zum Tetramer zusammen. Bei niedrigeren Konzentrationen wurden hingegen monomere und dimere Spezies für HFBI und HFBII beobachtet.

Wenn ScFlo11A in einem Puffer mit einem pH nahe des pI bei hohen Proteinkonzentrationen vorlag, zeigte sich bei Temperaturen unter 5 °C eine gelartige Aggregation. Diese war durch Erwärmen reversibel und konnte mehrfach wiederholt werden. Unter diesen Bedingungen sollte, ausgehend von den Biacore Daten, Flo11A mit sich selbst interagieren. Möglicherweise sorgt bei dieser

Gelbildung der hydrophobe Effekt, ebenso wie bei der Assemblierung der Hydrophobine, für eine Flo11-Zusammenlagerung zu oligomeren oder multimeren Spezies.

Die Flo11A Domäne könnte eine Kombination aus Hydrophobin, welches sich an Grenzschichten assemblieren kann und eines spezifischen homophilen Adhäsins sein. Somit könnte die Flo11A Domäne einen neuartigen Typ von Zellwandgebundenem Hydrophobin darstellen, wo die hydrophoben Oberflächen in Form von zwei aromatischen Bändern ausschlaggebend sind für die Spezifität und die Etablierung von multizellulären Strukturen.

### 5.3 Vergleich zwischen ScFlo11A und KpFlo11A1

Die Flokkuline Flo1, Flo5, Flo9, Flo10 und Flo11 aus *S. cerevisiae* wurden im Hinblick auf Regulation, Adhäsion und Phänotyp-Bildung bereits eingehend untersucht<sup>69, 107, 255</sup>. In *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b ist *FLO11* das einzige Mitglied aus dieser Familie, welches exprimiert wird. Die anderen *FLO* Gene sind still<sup>57, 71</sup>. Aufgrund einer *Nonsense*-Mutation in dem Transkriptionsfaktor *FLO8* wird *FLO11* in *S. cerevisiae* nicht (oder nur sehr schwach) exprimiert<sup>257</sup>. Die Analyse des Transkriptoms von *Komagataella pastoris* ergab, dass jeweils zwei Flokkuline des Flo5 Typs und zwei des Flo11 Typs in unterschiedlichen Mengen produziert werden (Tabelle 37).

Tabelle 37 Vergleich der relativen Transkriptmengen.

Stamm	Gen	Exp. W.	Stat. W.	Ausw.	Referenz
<i>S. cerevisiae</i> 288	<i>FLO11</i>	1,5 ± 0,5	8,3 ± 2,1	2 <sup>-ΔΔCT</sup>	96
<i>S. c.</i> 288 <i>FLO11+</i>	<i>FLO11</i>	1663 ± 103,1	652 ± 23,1	2 <sup>-ΔΔCT</sup>	96
<i>S. cerevisiae</i> $\Sigma$ 1278b	<i>FLO11</i>	63 ± 5,2	3,3 ± 1,1	2 <sup>-ΔΔCT</sup>	96
<i>K. pastoris</i> GS115	<i>FLO11-1</i>	5,2 ± 0,5	3,1 ± 0,1	ΔC <sub>T</sub>	D. Arbeit
<i>K. pastoris</i> GS115	<i>FLO11-2</i>	2,6 ± 0,1	1,7 ± 0,0	ΔC <sub>T</sub>	D. Arbeit
<i>K. pastoris</i> GS115	<i>FLO1</i>	8,1 ± 0,1	7,8 ± 0,0	ΔC <sub>T</sub>	D. Arbeit
<i>K. pastoris</i> GS115	<i>FLO2</i>	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	ΔC <sub>T</sub>	D. Arbeit



In früheren Studien wurden ebenfalls Transkriptomanalysen in *S. cerevisiae* durchgeführt<sup>79, 96</sup> (Tabelle 37). Die Expression von *FLO11* war dort in der exponentiellen Wachstumsphase stärker als in der frühen stationären Wachstumsphase. Dies entspricht den Beobachtungen für *FLO11* in dieser Arbeit, während die Expression der *FLO5*-artigen Gene davon nicht in diesem Ausmaß betroffen war. Die Regulation der Expression von *FLO11* ist komplex und umfasst neben externen Stimuli (Pheromone, Glukosemangel, pH, usw.) verschiedene Signaltransduktionswege<sup>78</sup>. Diese vielschichtige Regulation spiegelt auch die Diversität der verschiedenen Flo11-abhängigen Phänotypen wider. Die Regulation von *Flo11* in *K. pastoris* ist noch nahezu unbekannt und die in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptomanalyse stellt vermutlich eine der ersten Untersuchungen dieser Art in *K. pastoris* dar.

In *S. cerevisiae* gibt es nur einen Vertreter aus der Flo11 Familie, während Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10 alle zum Flo5/PA14 typ gehören. Dagegen gibt es in *Komagataella pastoris* GS115 mindestens drei Flo11 Paraloge.

In dieser Arbeit wurden die Kristallstrukturen von ScFlo11A und KpFlo11A1 analysiert.

Trotz vieler Gemeinsamkeiten auf struktureller Ebene zeigen sich auch Unterschiede in Bezug auf Interaktionsverhalten und die Verteilung der funktionellen Reste.

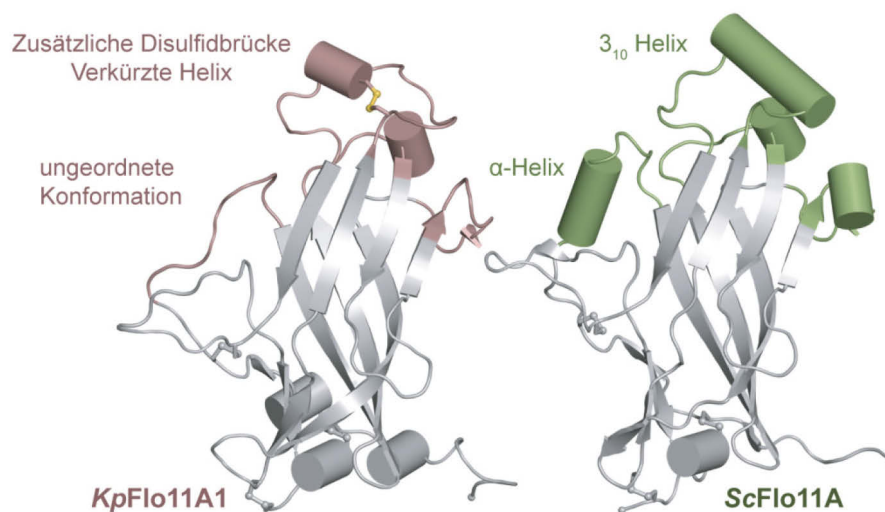
### 5.3.1 Struktureller Vergleich zwischen ScFlo11A und KpFlo11A1

Die Kristallstrukturen von ScFlo11A und KpFlo11A1 zeigen trotz einer Sequenzidentität von lediglich 30 % eine hochkonservierte 3D Struktur, welche bei beiden Flo11A Domänen aus einer zentralen Fibronectin Typ III Domäne besteht. Der r.m.s.d. beträgt 1,01 Å für 102 C $\alpha$  Atome nach struktureller Überlagerung (Abbildung 76A und B). Wie erwartet zeigt die FN III Domäne den höchsten Konservierungsgrad mit 0,7 Å über 61 C $\alpha$  Atome. Dahingegen zeigen der Rest von KpFlo11A1, die Neck Domäne und die Apical regions, große Unterschiede zu ScFlo11A auf.

Die Neck Domäne zeigt lediglich lokale strukturelle Unterschiede, da die drei Disulfidbrücken für die Verbindung zur FN III Domäne, konserviert vorliegen.

Interessanterweise sind diese drei Disulfidbrücken bei *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A* nicht konserviert, sondern lediglich zwei von drei Disulfidbrücken in der *Neck region* (Abbildung 67, Abschnitt 4.6.3). Ein weiterer Unterschied besteht in  $\beta 6$  von Faltblatt I, welches bei *KpFlo11A1* teilweise in die Neck Region hineinreicht, so dass diese aus nur drei  $\beta$ -Strängen besteht und nicht aus vier, wie bei *ScFlo11A*.

In dem Linker zwischen der *Neck* Domäne und der FN III Domäne findet sich bei *ScFlo11A* eine kleine  $\alpha$ -Helix, welche bei *KpFlo11A1* fehlt und stattdessen an dieser Position eine ungeordnete Konformation vorliegt (Abbildung 75).



**Abbildung 75** Vergleich der *Apical region* von *ScFlo11A* und *KpFlo11A1*. Die Helices sind als Zylinder dargestellt. Die *Apical region* ist in braun (*KpFlo11A1*) und grün (*ScFlo11A*) hervorgehoben. Die Hauptunterschiede sind schriftlich angezeigt.

Die *Apical region* zeigt mehrere strukturelle Unterschiede, besonders in der Region zwischen  $\beta 8$  und  $\beta 9$  (Abbildung 75). Bei *KpFlo11A1* findet sich hier eine zusätzliche Disulfidbrücke zwischen C143 und C152, welche in *ScFlo11A* fehlt. Daher ist die  $3_{10}$  Helix aus *ScFlo11A* in *KpFlo11A1* durch eine disulfidbrücken-gestützte *Loop*-region ersetzt. Diese Disulfidbrücke findet sich höchstwahrscheinlich ebenfalls in den Homologiemodellen von *KpFlo11-2A* und *KpFlo11-3A*. Die Bänder aus den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin befinden sich bei beiden Flo11A Domänen an den entsprechenden Enden der Domäne (Abbildung 76C). Dabei ist die Hälfte der oberflächen-exponierten aromatischen Reste von *ScFlo11A* zu *KpFlo11A1* entweder konserviert (W58, Y64, Y106, Y121, W155, W157, W184) oder von Tyrosinen zu Tryptophanen

getauscht (W99, W142). Die andere Hälfte hat dennoch hydrophobe Gegenstücke in ScFlo11A (V, L, F, P). Beide Flo11A Domänen haben einen ähnlich sauren isoelektrischen Punkt (pI) mit 5,2 (ScFlo11A-His<sub>6</sub>) und 5,5 (KpFlo11A1-His<sub>6</sub>). Daher zeigt sich parallel zur Verteilung der aromatischen Reste, dass auch die sauren Reste Aspartat und Glutamat in zwei Bändern gruppieren (Abbildung 76D). Allerdings zeigt sich hier, dass jeweils nur ein Drittel der sauren Reste von ScFlo11A zu KpFlo11A1 konserviert vorliegt (D61, E73, E76, D109, D141, D162, D172). Die anderen Zweidrittel bestehen aus anderen oberflächenexponierten Resten.

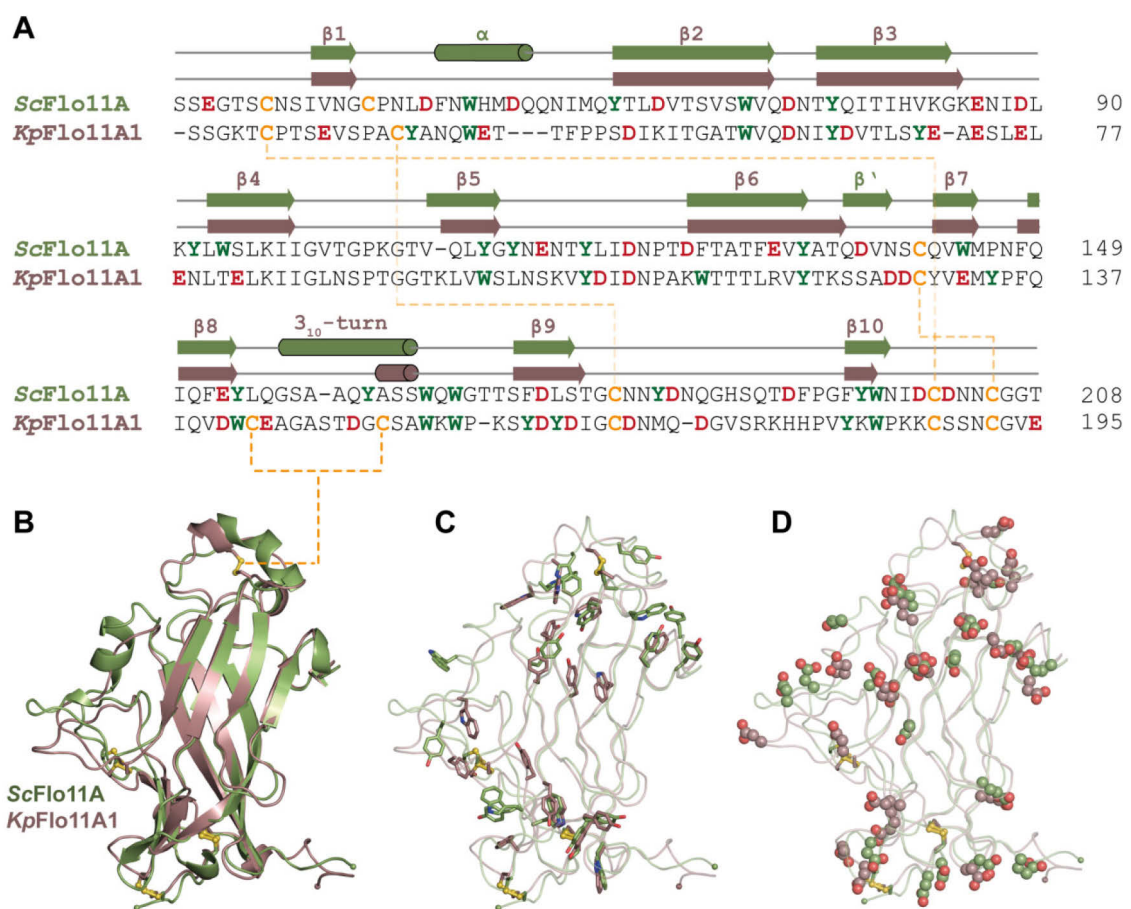
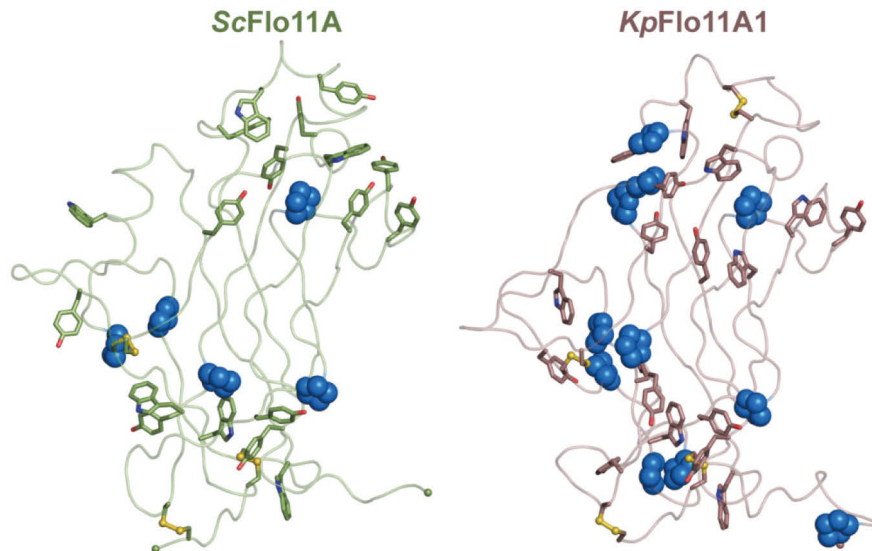


Abbildung 76 Struktureller Vergleich der Flo11A Domänen aus *S. cerevisiae* (ScFlo11A) und aus *K. pastoris* (KpFlo11A1). (A) Sequenzalignment von ScFlo11A und KpFlo11A1. Tryptophane und Tyrosine sind in grün, Glutamate und Aspartate in rot hervorgehoben. Die Disulfidbrücken-bildenden Cysteine sind in orange und die Disulfidbrücken als gestrichelte Linien dargestellt. KpFlo11A1 hat im Vergleich zu ScFlo11A eine weitere Disulfidbrücke. (B) Strukturelle Überlagerung zwischen ScFlo11A (grün) und KpFlo11A1 (braun). Der r.m.s.d. beträgt 1,05 Å für 685 Cα Atome. (C) und (D) Strukturelle Überlagerung von KpFlo11A1 und ScFlo11A mit hervorgehobenen Tryptophanen und Tyrosinen (C) und mit hervorgehobenen Aspartat und Glutamat Resten (D).

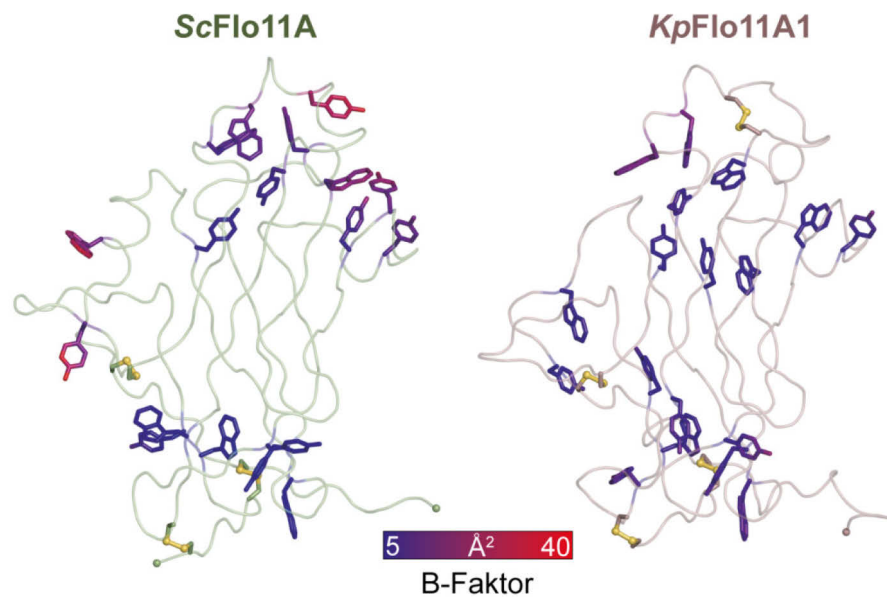
Neben dem Vorkommen von exponierten aromatischen und sauren Resten finden sich auch gehäuft Proline nach oder vor den aromatischen Resten (Abbildung 77).



**Abbildung 77** Vergleich von ScFlo11A und KpFlo11A1 mit hervorgehobenen aromatischen Resten und Prolinen (blau). Die Proline finden sich vor oder nach den aromatischen Resten.

In ScFlo11A finden sich 5 Prolin-Reste und in KpFlo11A1 sogar 10 Reste. Proline nehmen oft eine strukturelle Rolle ein, indem sie Schleifen und *Turns* stabilisieren. In einer Studie wurde die Adhäsion von ScFlo11 an Polystyrol durch *Phage Display* untersucht. Dabei zeigte sich, dass neben Tryptophan auch Proline eine wichtige Rolle bei der Adhäsion spielt<sup>95</sup>. Fast alle Proline kommen zusammen mit Tryptophanen oder Tyrosinen vor. Zudem sind sie teilweise ebenfalls oberflächenexponiert, sodass sie entweder direkt zur hydrophoben Interaktion beitragen oder indirekt, durch Stabilisierung der aromatischen Seitenketten.

Generell scheint die Verteilung der aromatischen und sauren Reste auf zwei oberflächenexponierte Bänder in beiden Flo11A Domänen ähnlich zu sein, obwohl sich strukturelle Unterschiede für die peripheren Regionen, die nicht Teil der FN III Domäne sind, zeigen. Dennoch sind die Oberflächen sehr rigide, wie die niedrigen B Faktoren für die oberflächenexponierten Aromaten zeigen (Abbildung 78).

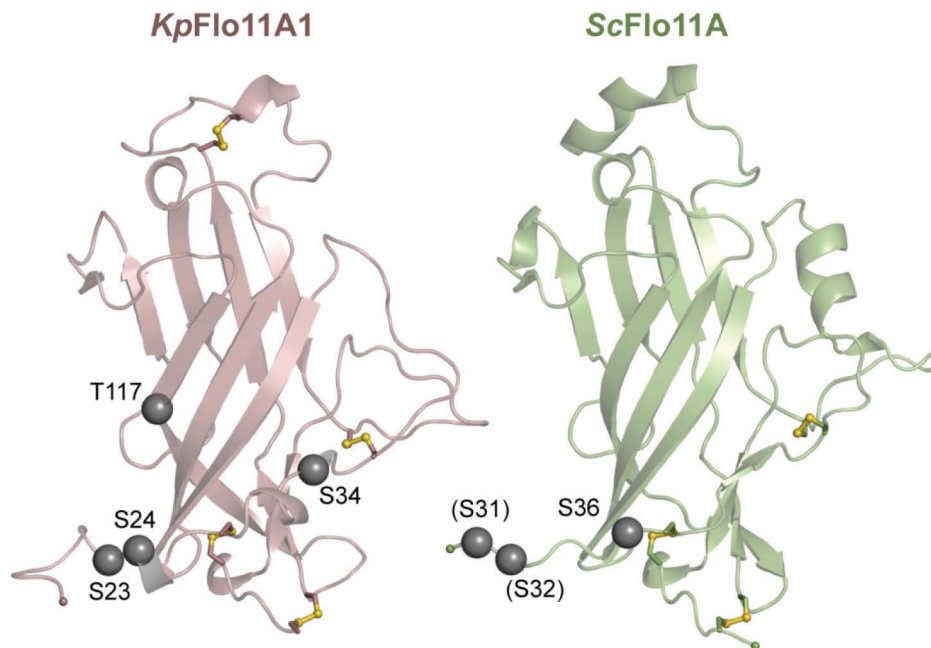


**Abbildung 78** Flexibilität der aromatischen Reste Tryptophan und Tyrosin in ScFlo11A und KpFlo11A1. Die hervorgehobenen aromatischen Reste sind nach Temperaturfaktoren (B Faktoren) gefärbt. Hohe Flexibilität ist durch rote Färbung angezeigt und geringe Flexibilität durch blaue Farbe.

### 5.3.2 Glykosylierung von ScFlo11A und KpFlo11A1

In dieser Arbeit wurden die Flo11A Domänen in *E. coli* produziert und verfügen dabei über keine posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen, wie das bei ihren Ursprungsorganismen *S. cerevisiae* bzw. *K. pastoris* der Fall ist. Um mögliche Glykosylierungsstellen in ScFlo11A und KpFlo11A1 zu identifizieren, wurde mit Hilfe des NetOGlyc-Servers eine Vorhersage über mögliche N- bzw. O-Glykosylierungen innerhalb der Flo11A Domänen durchgeführt. Dabei wurde keine N-Glykosylierungsstelle gefunden.

Für KpFlo11A1 konnten vier mögliche O-Glykosylierungsstellen mit einer Wahrscheinlichkeit größer als 50 % gefunden werden. Für ScFlo11A drei mögliche O-Glykosylierungsstellen, wobei S31 und S32 lediglich eine Wahrscheinlichkeit von 42 bzw. 45 % aufweisen. Die Glykosylierungsstellen befinden sich hauptsächlich in oder um die *Neck region* (Abbildung 79).



**Abbildung 79** Struktur von *KpFlo11A1* und *ScFlo11A* mit vorhergesagten O-Glykosylierungsstellen als graue Kugeln. Die Vorhersage wurde mit Hilfe des NetOGlyc 4.0 Server<sup>258</sup> durchgeführt. Die Reste S31 und S32 sind in Klammern, da die Wahrscheinlichkeit für Glykosylierung nur bei 0,42 und 0,45 liegt.

Eine Studie von *Meem* und *Cullen* ist der Frage nachgegangen, inwiefern die Glykosylierung die Funktion und Regulation von Flo11 beeinflusst<sup>259</sup>. Dabei zeigte sich, dass eine Glykosylierung von Flo11 für invasives Wachstum und Biofilm/Matten Bildung in *S. cerevisiae* nötig ist. Die Glykosylierung hatte indes keinen Einfluss auf die Lokalisation auf der Zelloberfläche oder die adhäsiven Eigenschaften, an andere Zellen zu binden. Dies wurde mit einem *in vitro* Bindungs-Assay untersucht, der zeigte, dass nicht-glykosyliertes Flo11 in der gleichen Qualität und Quantität an Wildtyp Zellen binden konnte wie glykosyliertes Flo11. Im Hinblick auf diese Studie sind die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht von der Glykosylierung betroffen. In einem weiteren Versuch stellte sich allerdings heraus, dass die Glykosylierung zur generellen Stabilität beiträgt. Dies ist insofern plausibel, da auch für andere Proteine gezeigt werden konnte, dass glykosylierte Proteine besser vor Proteindegradation geschützt sind als nicht-glykosylierte Proteine<sup>231</sup>.

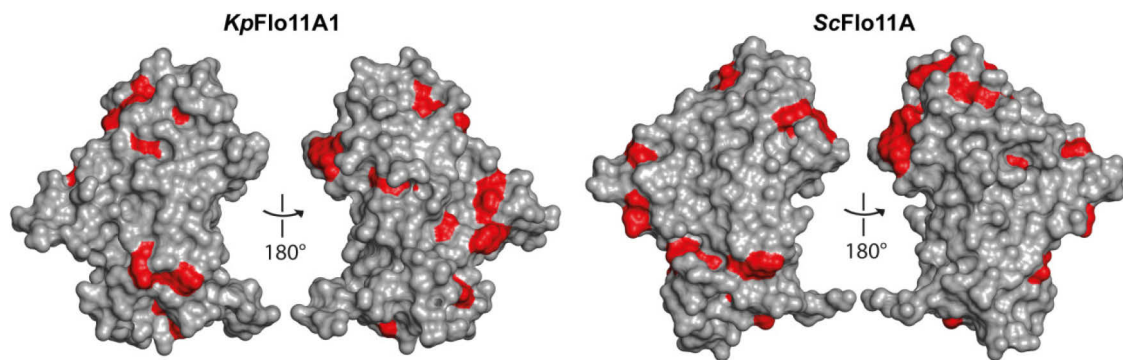
### 5.3.3 Interaktionsverhalten von ScFlo11A und KpFlo11A1

Die Strukturen der Flo11A Domänen verfügen über zwei Bänder mit aromatischen Resten, eingebettet in Streifen von sauren Resten. Homophile Flo11A-Flo11A Interaktionen finden nur bei niedrigem pH statt, wenn die Proteine mehr oder weniger ungeladen vorliegen. Bei höherem pH ist die Abstoßung durch die negativ geladenen sauren Reste größer als die Anziehung durch die aromatischen Reste. Der niedrige pI beider Flo11A Domänen von 5,2 bzw. 5,5 entspricht auch dem natürlichen Habitat von Hefen. Insbesondere bei der Flokkulation muss der pH-Wert leicht über dem pI sein<sup>260</sup>.

Die homophilen Flo11A-Flo11A Interaktionen finden mit vergleichbaren Affinitäten statt. So konnte für die ScFlo11A-ScFlo11A Interaktion eine  $K_D$  von  $19,5 \pm 2,3 \mu\text{M}$  bestimmt werden, während die KpFlo11A1-KpFlo11A1 Interaktion mit  $31,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$  in der gleichen Größenordnung liegt. Die Affinität der heterophilen ScFlo11A-KpFlo11A1 ist dagegen deutlich reduziert mit einer  $K_D$  von  $121,1 \pm 9,3 \mu\text{M}$ . Die Analyse der Kinetik der Bindung ergab allerdings, dass die Werte für die Dissoziation sowohl für die homophilen, als auch die heterophile Interaktion sehr ähnlich waren, während die Werte für die Assoziation für die heterophile Interaktion deutlich langsamer waren im Vergleich mit den homophilen Interaktionen.

Die für die Interaktion verantwortlichen aromatischen Bänder sind bei beiden Flo11A Domänen zwar ähnlich, aber auf struktureller Ebene verschieden (Abbildung 80). Eine Bindung findet statt, wenn beide Partner in der korrekten Orientierung für konformationelle Änderungen aufeinander treffen. Im Falle der hydrophoben Interaktionen geht mit diesen Änderungen ein teilweiser Verlust der Hydrathülle einher. Nach erfolgter Assoziation zwischen zwei Flo11A Domänen durch den hydrophoben Effekt, ist die Dissoziation ähnlich für die hetero- und homophilen Interaktionen, wie durch den ähnlichen  $k_{\text{off}}$  Wert angezeigt.





**Abbildung 80** Oberflächeneigenschaften von *KpFlo11A1* und *ScFlo11A*. Die Gesamtoberflächen sind in grau dargestellt, während die exponierten aromatischen Reste Tryptophan und Tyrosin in rot hervorgehoben sind. Beide Flo11A Domänen zeigen zwar die Anordnung der aromatischen Reste in zwei oberflächenexponierten Bändern, aber lokal zeigen sich strukturelle Unterschiede.

Die langsamere Assoziation der heterophilen *ScFlo11A-KpFlo11A1* Interaktion kommt vermutlich durch eine erschwerte Dehydratisierung und/oder andere konformationelle Änderungen, woran die aromatischen Bänder und apikalen Regionen beteiligt sind. Diese erschwerte Interaktion könnte von einer verringerten sterischen Komplementarität herrühren. Somit könnte die Struktur der Flo11A Domäne einen Beweis liefern für die Spezifität der homophilen Flo11A-Flo11A Interaktion. Dennoch kann die heterophile *ScFlo11A-KpFlo11A1* Interaktion immer noch stattfinden, wenn auch mit verringerter Affinität. Die reduzierte Bindungsstärke wird vermutlich durch nicht-komplementäre Interaktionen zwischen den aromatischen Oberflächenbändern verursacht.

Diese Eigenschaften von Flo11A, feste homophile Interaktionen und reduzierte heterophile Bindungen einzugehen, geben ihm ein Alleinstellungsmerkmal unter den Flokkulinen und könnten erklären, warum es an der Ausbildung von mehreren unterschiedlichen Phänotypen beteiligt ist. So wurde in mehreren Studien gezeigt, dass Flo11 an der Adhäsion an Plastik beteiligt ist<sup>77, 95</sup>. Des Weiteren ist Flo11 an der Ausbildung von Biofilmen beteiligt, was die Eigenschaft der homophilen Adhäsion als auch die Adhäsion an Oberflächen erfordert<sup>109, 110, 116</sup>. Die Flo11A Domäne scheint mit ihren strukturellen Eigenschaften für diese Aufgabe sehr gut geeignet, da sie spezifische homophile Interaktionen, aber auch bis zu einem gewissen Grad heterophile Interaktionen eingehen kann. Dabei ist noch nicht geklärt, ob die Eigenschaft der heterophilen Interaktion lediglich ein Nebeneffekt des generellen hydrophoben Charakters der Flo11A Domäne darstellt oder ob es ein wesentlicher Bestandteil für die Oberflächenadhäsion im



natürlichen Habitat der Hefen ist. So könnten multizelluläre Strukturen wie z.B. Biofilme auf Oberflächen von Pflanzen, Insekten oder anderen etabliert werden.

Die Bindungsaffinitäten der Flo11A-Flo11A Interaktionen liegen eher im Bereich niedriger Affinität im Vergleich mit anderen Protein-Protein Interaktionen (Tabelle 38).

**Tabelle 38 Protein-Protein Interaktionen.** Unter polare Interaktionen fallen ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, etc. im Gegensatz zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Aminosäuren. SPR (Oberflächenplasmonresonanz)

Protein 1	Protein 2	Interaktion*	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	Methode	Referenz
Erythropoietin	EPO Rezeptor	Polar	$3,7 * 10^{-6}$	SPR	261, 262
A-Amylase	Tendamistat	Polar und hydrophob	$9,2 * 10^{-6}$	SPR	263, 264
Ran GTPase-GDP	Importin $\beta$	Polar	$1 * 10^{-3}$	Fluoreszenz Titration	265, 266
Neurologin-1	Neurologin-1- $\beta$	Polar	$9,7 * 10^{-2}$	ITC	267
Adrenoxin Reduktase	Adrenoxin	Polar	0,86	SPR	268
CD2	CD58	Polar	9,0	SPR	248, 269, 270
UEV Domäne	Ubiquitin	Polar	635,0	SPR	271, 272

Die Art der Flo11A-Flo11A Interaktion gründet sich auf den hydrophoben Effekt und die Bindungsenergie von hydrophoben Wechselwirkungen ist etwas geringer im Vergleich zu Wasserstoffbrücken und ionischen Bindungen. Des Weiteren zeigen die in Tabelle 38 aufgeführten Proteine hohe Spezifität für einen Liganden, der ihr natürlicher Bindungspartner ist. Die Eigenschaften der Flo11A Domäne ermöglichen sowohl homophile als heterophile Interaktionen z.B. mit Oberflächen. Ein etwas breiteres Bindungsspektrum geht dann zu Lasten der Spezifität. Zudem wurden hier die Bindungsstärken *in vitro* bestimmt. *In vivo* findet sich eine Vielzahl an Molekülen auf der Zelloberfläche, wodurch sich die Bindungskraft erhöht. In den SPR Experimenten wurde lediglich die Affinität einer einzelnen Flo11A-Flo11A Interaktion gemessen, während auf zellulärer Ebene die Gesamtheit aller Affinitäten (Avidität) eine Rolle spielt.

Der Avidität kommt besonders bei der Bindung von ScFlo5A an verschiedene Mannosereste eine entscheidende Funktion zu. Diese Bindung befindet sich im

niedrigen millimolaren Bereich und ist damit etwa drei Größenordnungen schwächer als die Flo11-Flo11A Interaktion<sup>49</sup>. Die Flo11A-Flo11A Interaktion ist beschränkt auf die Anzahl an Flo11A Domänen auf der Zelloberfläche, während die Liganden für ScFlo5A, terminale Mannose- $\alpha$ 1,2-Mannose Disaccharide, ubiquitär auf der Zelloberfläche von Hefen vorhanden sind.

#### **5.3.4 Die Flo11A Domäne als *Green Beard Gene*?**

Flokkulation ist ein Beispiel für kooperatives Verhalten, indem eine große Anzahl an Zellen sich zusammenlagern, um sich gegenseitig vor schädlichen Umwelteinflüssen zu schützen<sup>39</sup>. Dieser Prozess wird in Hefen durch Flokkuline wie *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* und *FLO10* gesteuert. Werden diese Gene exprimiert, assoziieren alle Zellen, die diese Proteine auf der Zelloberfläche tragen. Damit erfüllen diese Flokkuline die Definition sogenannter „*Green Beard Genes*“. Träger dieser Gene bevorzugen, laut der Definition von Richard Dawkins, die Kooperation mit Trägern desselben Gens<sup>273</sup>. Dabei wurde das Konzept der *Green Beard Genes* von William D. Hamilton vorgeschlagen<sup>274, 275</sup> und bekam den Namen durch ein Beispiel von Richard Dawkins<sup>276, 277</sup> („*Ich habe einen grünen Bart und werde mich jedem gegenüber, der ebenfalls einen grünen Bart trägt, altruistisch verhalten*“). Die Funktion eines *Green Beard Gene* verbindet den Mechanismus der Selbsterkennung mit kooperativem Verhalten, was von den Flokkulinen der Flo5-Gruppe erfüllt wird. Sie erkennen spezifisch terminale Mannose-Reste auf der Zelloberfläche. Zellen, die kein solches Flokkulin auf der Zelloberfläche präsentieren, können dennoch von anderen Flokkulin-präsentierenden Zellen über ihre Mannose-Reste erkannt werden. Solche „Cheater“-Zellen, die kein Flokkulin haben, finden sich dann in der nicht-geschützten Peripherie der gebildeten Flocken<sup>39</sup>.

Die Rolle der Flokkuline Flo5 und Flo1 als *Green Beard Genes* wurde bereits eingehend beleuchtet und experimentell untersucht<sup>39, 49</sup>. Flo11 unterscheidet sich von den übrigen Flokkulinen durch seinen Interaktionsmechanismus mit anderen Flo11 Molekülen, sodass die Flo11-Flo11 Interaktion eine *kinship* (Verwandtschaft) von einer *non-kinship* Interaktion diskriminieren kann. Dabei zeigte es eine höhere Affinität für homophile Interaktionen gegenüber heterophilen Interaktionen. Die Flo1/Flo5-Mannose Interaktion kann eine solche *kinship/non-kinship* Unterscheidung nicht treffen bzw. wäre der Effekt gering, da

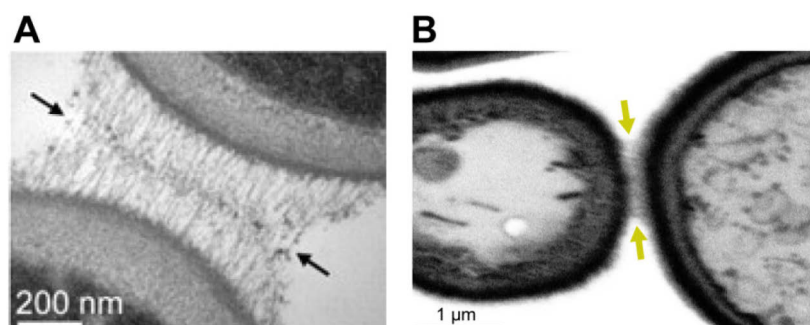
der Ligand (Mannose) sowohl für Flo5 als auch Flo1 ubiquitär auf der Zelloberfläche der Hefe vorhanden ist. In einem Zellverband könnte in Bezug auf die *Green Beard Genes* somit nicht unterschieden werden, ob die Zelle Flo1 oder Flo5 bzw. verschiedene Allele davon auf der Zelloberfläche präsentiert (in Bezug auf die *Green Beard* Hypothese wäre dies die Existenz verschieden farbiger Bärte). Die Selbsterkennung bezieht sich hier auf Zellen, die ein solches Flokkulin exprimieren, im Unterschied zu sog. „Cheater-Zellen“, die kein Flokkulin auf der Zelloberfläche tragen. Der Mechanismus der Selbsterkennung ist demnach bei der Flo1/Flo5-Mannose Interaktion verschieden von der Flo11-Flo11 Interaktion. Bei der Flo11-Flo11-Interaktion könnte eine „Cheater-Zelle“, die kein Flo11 auf der Zelloberfläche trägt, gar nicht erst in den Zellverband aufgenommen werden. Die Bindung zwischen Zellen, die identische *FLO11* Moleküle auf der Oberfläche exprimieren sind stärker gegenüber Zellen, die unterschiedliche *FLO11* Gene exprimieren. Eine heterophile Interaktion ist aber dennoch möglich, wenn auch mit verminderter Affinität, womit kooperatives Verhalten auch zwischen Zellen, die unterschiedliche *FLO11A* Domänen exprimieren, noch möglich wäre. Aufgrund des Bindungsmechanismus der Flo11-Flo11 Interaktion wird Kooperativität zwischen Flo11-präsentierenden Zellen gefördert, während nicht-exprimierende Zellen („Cheater“) aus dem Zellverband ausgeschlossen werden müssen. Mit diesen Eigenschaften ähnelt Flo11 *csaA* aus *Dictyostelium discoideum*, dem Musterbeispiel eines *Green Beard Genes*<sup>39</sup>. *csaA* ist ebenfalls ein homotypisches Bindeprotein, welches für Zell-Zell Interaktionen verantwortlich ist. Zellen, die keine funktionelle Kopie von *csaA* tragen, werden nicht in den Fruchtkörper aufgenommen und haben so eine schlechtere Möglichkeiten, Sporen zu bilden, um Stressperioden zu überdauern<sup>278</sup>.

Die biologische Funktion von Flo11 ist noch nicht gänzlich geklärt, daher kann über soziales Verhalten keine abschließende Antwort gegeben werden. Dennoch könnte Flo11 aufgrund seiner bisher untersuchten Eigenschaften in die Kategorie der *Green Beard Genes* fallen.

## 5.4 Das Flo11A-Flo11A Interaktionsmodell

In der Gruppe der Flokkuline (Flo1, Flo5, Flo9, Flo10 und Flo11) ist Flo11 das Flokkulin, welches als letztes entdeckt wurde<sup>69, 102</sup>. Es wurde zunächst dem

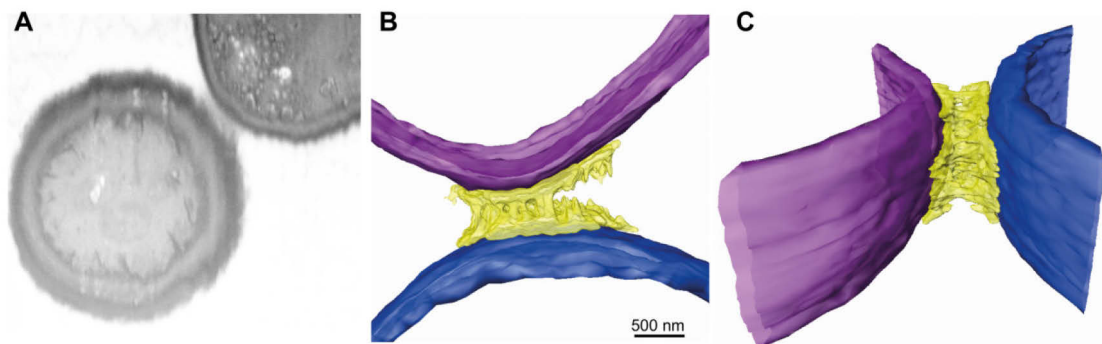
Flo1-Typus zugerechnet, da sich die Flokkulation *in vivo* durch Mannose inhibieren ließ und Calcium-abhängig zu sein schien<sup>77</sup>. In späteren Studien konnte bei *in vitro* Experimenten mit glykosyliertem, aus *S. cerevisiae* aufgereinigtem Protein, keine Mannose-Abhängigkeit gefunden werden<sup>210</sup>. In dieser Arbeit wurden mit dem unglykosylierten, aus *E. coli* aufgereinigtem Protein, Bindungsexperimente mit Calcium und Mannose/Calcium durchgeführt und auch dort konnte gezeigt werden, dass eine Mannose und/oder Calcium-Abhängigkeit nicht besteht. In späteren Studien gab es dann Hinweise auf eine homotypische Flo11A-Flo11A Interaktion über hydrophobe Wechselwirkungen, da mit der Expression von Flo11 eine gesteigerte Zelloberflächenhydrophobizität einherging<sup>85</sup>. 2011 wurde eine Studie veröffentlicht, die mittels Transmissionselektronenmikroskopie hochaufgelöste Strukturen einer *FLO11-FLO11* Interaktion *in vivo* zeigt (Abbildung 81A). Die Zellen sind dort durch lange Fibrillen verbunden, die eine „reißverschluss-artige“ Struktur ausbilden. In dieser Arbeit wurden in einer Kooperation mit Dr. Daniel Rhinow (MPI Frankfurt) und Dr. Stefan Brückner (Uni Marburg) ebenfalls elektronenmikroskopische Untersuchungen mit *FLO11* (von *S. cerevisiae* S288C) exprimierenden Zellen durchgeführt (Abbildung 81B). Auch dort zeigte sich, wenn auch nicht in gleicher Auflösung, dass der Zwischenraum zwischen *FLO11*-exprimierenden Zellen von einem filamentösen Material gefüllt war. Diese Intrazellulären Fibrillen korrespondieren in ihren Abmessungen mit dem oberflächen-exponierten Flo11 Molekülen (1325 Aminosäuren) und sind abwesend bei Zellen, welche *FLO11* nicht exprimieren.



**Abbildung 81** Flo11-Flo11 Interaktion *in vivo*. (A) Transelektronen-Mikroskopie von *FLO11* exprimierenden Zellen aus einer Studie von Vachova *et al.* von 2011<sup>279</sup>. (B) Tomogramm der FIB-SEM Aufnahmen von *FLO11* exprimierenden Zellen aus dieser Arbeit.

Die Aufnahmen zeigen zudem sehr breite Kontaktstellen zwischen den Zellen von 0,5 bis 1,5 µm im Durchmesser und 0,2 µm in der Schichtdicke. Dieser Zell-

Zell-Abstand scheint deutlich größer zu sein als der Flo1- oder Flo5-vermittelte Kontakt in Hefeflocken<sup>280</sup>. Eine weniger dichte Packung der Flo11-vermittelten multizellulären Strukturen gegenüber der Flo1/Flo5-induzierten Hefeflocken könnte von Vorteil sein, da es freie Diffusion von Nährstoffen und sogar den Einschluss von Gasbläschen ermöglicht, wie es der Bildung von Hefe-Flor förderlich ist. In Kooperation mit Dr. Daniel Rhinow und Dr. Stefan Brückner wurde FIB-SEM auch an *FLO11*-exprimierenden *Saccharomyces cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b Stämmen durchgeführt. Die Analysen wurden analog zu denen mit *S. cerevisiae* S288C durchgeführt. Allerdings zeigten die  $\Sigma$ *FLO11* exprimierenden Zellen etwas ausgeprägtere Zell-Zell-Kontakte im Vergleich zu den *ScFLO11* exprimierenden Zellen (Abbildung 82). Auf struktureller Ebene unterscheidet sich  $\Sigma$ Flo11A hauptsächlich durch eine 15 Aminosäuren lange Insertion von *ScFlo11A*. Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob diese Insertion für den stärkeren Phänotyp verantwortlich ist oder ob noch weitere Faktoren eine Rolle spielen.

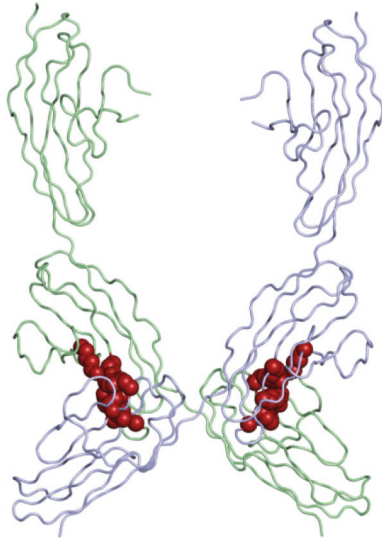


**Abbildung 82** Flo11-Flo11 Interaktionen von *Saccharomyces cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b. (A) Tomogramm der  $\Sigma$ Flo11- $\Sigma$ Flo11 Interaktion. (B) und (C) Rekonstruktion der Zellen. Die  $\Sigma$ Flo11- $\Sigma$ Flo11 Interaktion ist in gelb, die Zellwände in blau und lila gefärbt.

#### 5.4.1 Flo11A-Flo11A Interaktion *in vitro*

Die SPR-Analysen ergeben Dissoziationskonstanten von 20  $\mu$ M für die *ScFlo11A*-*ScFlo11A* bzw. 30  $\mu$ M für *KpFlo11A1*-*KpFlo11A1* bei pH 5,5. Allerdings zeigten weder analytische Gelfiltration, noch SAXS Experimente entsprechende Dimer-Bildung unter diesen Bedingungen in Lösung.

Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass es kein genau definiertes Interaktions-Interface gibt, wie es z.B. für das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM definiert wurde (Abbildung 83). NCAM gehört ebenfalls zur Immunoglobulin-



**Abbildung 83** Interface der Domänen Igl und IgII von NCAM. Cα von Molekül 1 ist in grün und Cα von Molekül 2 in lila dargestellt. Die Reste des interface sind als rote kugeln dargestellt. Die Analyse wurde mit *PDBePISA* durchgeführt. PDB ID: 1QZ1.

Superfamilie und vermittelte homophile Zell-Zell Interaktionen. Die Interaktion zwischen den Domänen Igl und IgII wurde durch NMR bestätigt und die Reste, die an der Interaktion beteiligt sind, identifiziert<sup>281, 282</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass die beiden Domänen Igl und IgII auch in Lösung ein stabiles Dimer bilden<sup>282</sup>. Die Affinität der beiden Domänen zueinander ist mit 3 nM auch deutlich höher im Vergleich zur Flo11A-Flo11A Interaktion<sup>283</sup>. Die physiologische Relevanz dieses Dimers wurde u.a. durch Lösen der Kristallstruktur bestätigt.

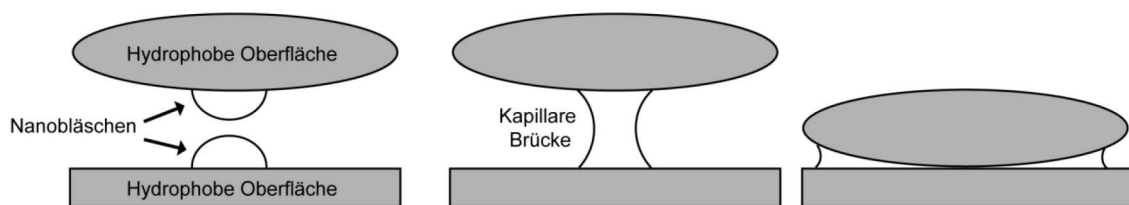
Mit der Kristallstruktur von NCAM bestehend aus den Domänen Igl-III (PDB code: 1QZ1) wurde eine *Interface*-Analyse mit Hilfe des *PDBePISA* Servers durchgeführt (Abbildung 83). Die Reste des Interface sind als rote kugeln hervorgehoben und zeigen das physiologisch relevante Interface der NCAM-NCAM Interaktion.

Für die Flo11A-Flo11A Interaktion existiert möglicherweise kein so definiertes und stabiles Dimer in der gleichen Orientierung in Lösung bei pH 5,5 wie es z.B. in der Rekonstruktion der Kristallpackung auftritt. Durch die Verteilung der aromatischen Reste auf zwei Bänder wären in Lösung, wo eine freie Orientierung der Moleküle möglich ist, mehrere mögliche Interaktionsmuster zwischen den Flo11A Domänen denkbar. Die Flo11A-Flo11A Interaktion beruht auf hydrophoben Interaktionen. Diese Wechselwirkungen müssen nicht sterisch komplementär sein, vor allem, wenn die durch den hydrophoben Effekt getrieben sind. Vielmehr könnte Flo11A durch Erhöhung der Hydrophobizität sowohl homophile als heterophile Interaktionen mit Zellen bzw. Oberflächen ermöglichen.

Die NCAM-NCAM Interaktion ist eine sehr spezifische, *short-range* Interaktion. Die hydrophobe Flo11A-Flo11A Interaktion dagegen ist eine auf dem hydrophoben Effekt beruhende *long-range* Interaktion. Diese sind im Vergleich zu den *short-range* Interaktionen eher unspezifisch, können dafür aber größere

Reichweiten von bis zu 200 Å haben<sup>284-286</sup>. Eine solche *long-range* Interaktion wäre für die Flo11-Flo11 Interaktion denkbar und könnte auch die Fibrillenartigen Strukturen zweier *FLO11*-exprimierender Zellen in den FIB-SEM Tomogrammen erklären. Der Vorteil gegenüber den spezifischen *short-range* Interaktionen läge in der größeren Distanz, wo andere Interaktionskräfte nicht hinreichen können.

Auf molekularer Ebene ist es nicht gänzlich geklärt, wie hydrophobe Interaktionen über so große Distanzen ( $> 200$  Å) stattfinden können. Eine Theorie beinhaltet die Bildung von submikroskopischen Bläschen (Nanobläschen)<sup>284, 287</sup>. So könnte sich eine konkave „Kapillare Brücke“ zwischen zwei hydrophoben Oberflächen entstehen, welche eine anziehende Kraft produzieren könnte (Abbildung 84).



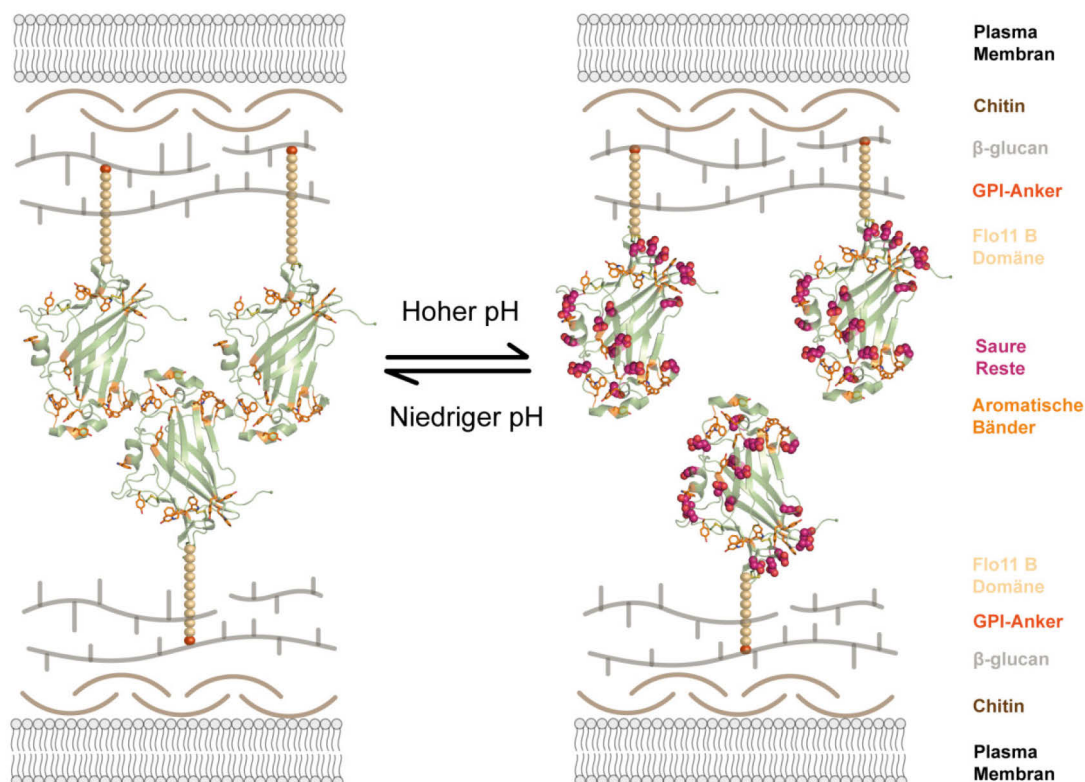
**Abbildung 84 Vereinfachter Mechanismus der Bildung von Nanobläschen zwischen zwei hydrophoben Oberflächen in einem Flüssigkeitsfilm. Die Nanobläschen interagieren miteinander, wodurch eine „Kapillare Brücke“ entsteht und es zur Anziehung zwischen den hydrophoben Oberflächen kommt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Hampton und Nguyen<sup>288</sup>.**

Solche submikroskopischen Bläschen sind allerdings schwer zu visualisieren. Eine Interaktion über solche Nanobläschen würde dann nur indirekt auf hydrophoben Interaktionen beruhen (eher auf Kapillarkräften) und so sind die meisten gemessenen hydrophoben Interaktionen im Bereich von  $< 200$  Å<sup>284</sup>. Diese Gasbläschen wurden bisher auch lediglich bei Oberflächen-Oberflächen Interaktionen in Lösung beobachtet. Die Oberflächen sind mit diesen Gasbläschen in Lösung überzogen und bilden dann „Gas-Brücken“ bei ihrer Interaktion<sup>289, 290</sup>. Es bleibt daher fraglich, ob ein solcher Mechanismus auch bei der Zell-Zell-Interaktion möglich ist.

#### 5.4.2 Interaktion über aromatische Bänder

Die Rekonstruktionen der Kristallpackungen von ScFlo11A und KpFlo11A1 zeigten unabhängig voneinander in jeweils verschiedenen Kristallformen ein

*Clustern* über die Aromatischen Bänder. Diese Übereinstimmung, zusammen mit den beobachteten Interaktionen bei pH 5,5, wenn die Domänen nahezu ungeladen sind, macht es wahrscheinlich, dass die Flo11A-Flo11A vermittelte Interaktion über die aromatischen Reste Tryptophan und Tyrosin abläuft (Abbildung 85). Trotz der verschiedenen kristallformen zeigt sich kein eindeutiges Muster, was ebenfalls für eine Kollektiveigenschaft der Flo11-Flo11 Interaktion spricht und weniger für eine sehr hohe Spezifität, wie im Fall der NCAM-NCAM Interaktion.



**Abbildung 85 Modell der Flo11-Flo11 Interaktion durch Interaktion der aromatischen Bänder.** Das Modell zeigt die Interaktion zwischen Flo11A Domänen aus *S. cerevisiae*, wie sie in der Kristallpackung von ScFlo11A in der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  gefunden worden.

Die Flo11A Domänen werden über die B-Domänen auf der Zelloberfläche präsentiert und können bei entsprechenden niedrigem pH, was auch den natürlichen Bedingungen der Zuckerhefen entspricht, miteinander interagieren. Bei hohem pH, wenn die A-Domänen negativ geladen sind, überwiegt die Abstoßende Kraft der negativ geladenen Reste gegenüber der hydrophoben Wechselwirkung durch die aromatischen Reste.



Die Flo11A Domäne kann allerdings nicht nur spezifische homophile Zell-Zell-Interaktionen vermitteln, sondern ist zu einem gewissen Grade auch in der Lage heterophile Interaktionen einzugehen wie anhand der ScFlo11A-KpFlo11A1 Interaktion dargelegt. Dies ist notwendig um multizelluläre Strukturen wie Biofilme auszubilden, wo spezifische Zell-Zell-interaktionen als auch Wechselwirkungen mit Oberflächen vermittelt werden müssen (Abbildung 86).

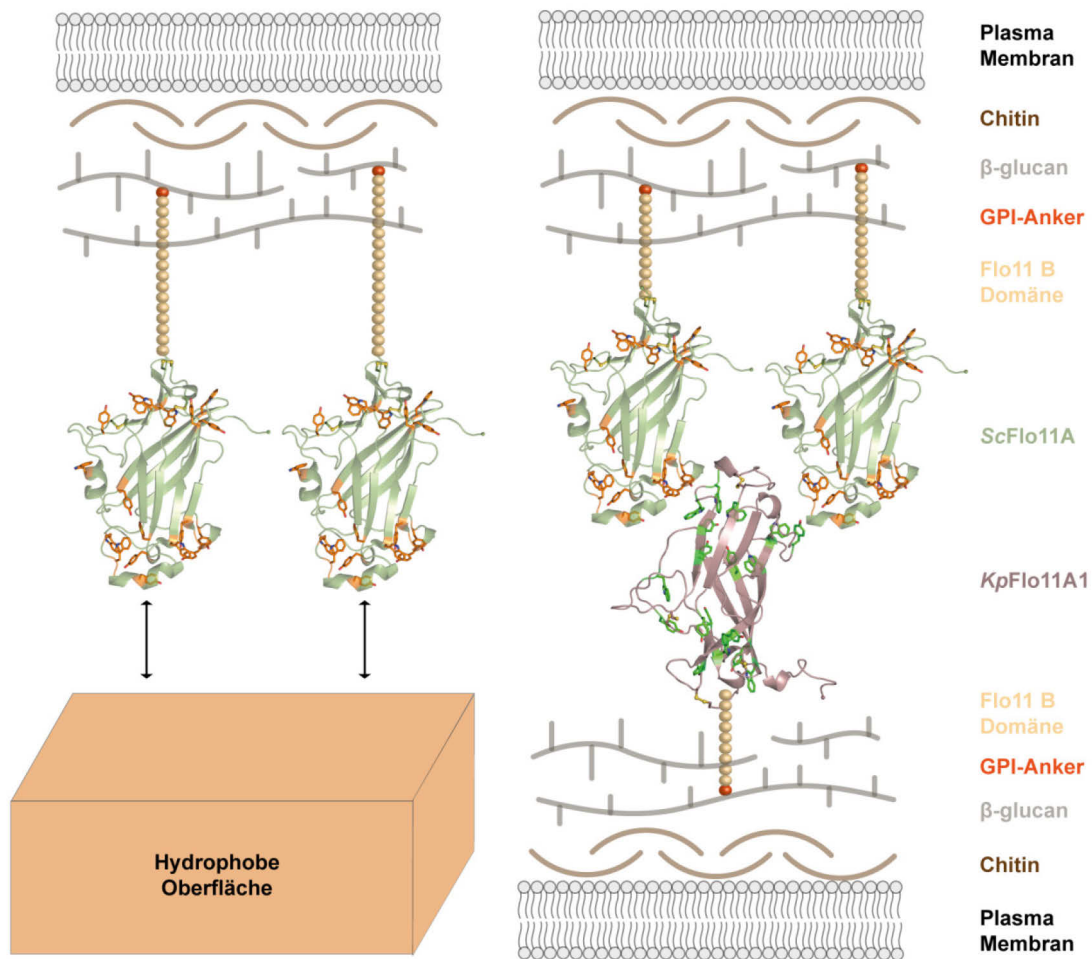


Abbildung 86 Modell der heterophilen Flo11A Interaktionen. Flo11A vermittelte Interaktion mit Oberflächen (links) und anderen Flo11A Domänen am Beispiel von KpFlo11A1 (braun).

#### 5.4.3 Die „gebündelte“ Kraft von Flo11A

Das in Abbildung 85 vorgestellte Modell der Flo11-Flo11 Interaktion geht von einer 1:1 Bindung aus, wo zwei Flo11A Domänen miteinander interagieren. Dabei wurde die B-Domäne auf die Funktion der Präsentation der A-Domäne beschränkt. 2009 wurden in einer Studie in mehreren Hefeadhäsinen Amyloid-Strukturen vorhergesagt und experimentell nachgewiesen<sup>48</sup>, darunter auch

Flo11 aus *S. cerevisiae*. Die Vorhersage erfolgte dabei mit Hilfe des Programms *TANGO*, zur Vorhersage von  $\beta$ -Amyloid bildenden Strukturen<sup>291-293</sup>. Solche  $\beta$ -Aggregate bilden geordnete Strukturen von gestapelten, parallelen  $\beta$ -Strängen aus. Dabei finden sich sehr häufig  $\beta$ -verzweigte Aminosäuren (Thr, Val, Ile), die die Interaktionen zwischen den Strängen stabilisieren. Protein-Amyloide sind charakteristisch für Proteinaggregate bei neurodegenerativen Krankheiten<sup>294, 295</sup>, wurden aber auch für pilzliche Hydrophobine<sup>296</sup> oder den Als Adhäsinen von *Candida glabrata*<sup>48, 297</sup> nachgewiesen. Bei den Adhäsinen könnten auf diese Weise mehrere B-Domänen miteinander interagieren und damit mehrere A-Domänen bündeln. Somit könnte die „Gesamtheit der Affinitäten“ (Avidität) genutzt werden um die Zell-Zell-Adhäsion zu verstärken. Für die Flo11-Flo11 Interaktion erscheint eine solche Bündelung rational, wenn man bedenkt, dass einzelne hydrophobe Wechselwirkungen (1:1) schwach sind. Im Kollektiv dagegen könnte sich die Gesamtbindungsstärke deutlich erhöhen. In dieser Arbeit wurde der *TANGO* Server benutzt, um Vorhersagen über ein mögliches  $\beta$ -Aggregation-Verhalten von ScFlo11 und KpFlo11-1 treffen zu können (Tabelle 39).

**Tabelle 39** Sequenzen aus den B-Domänen von ScFlo11 KpFlo11-1, KpFlo11-2 und KpFlo11-3, die ein hohes Potential für die Ausbildung von  $\beta$ -Amyloid-Strukturen haben. Es wurden nur Sequenzen verwendet, deren Wahrscheinlichkeit zur  $\beta$ -Aggregation über 30 % liegt. Die Analysen wurden mit Hilfe des *TANGO* Servers durchgeführt<sup>267, 291-293</sup>.

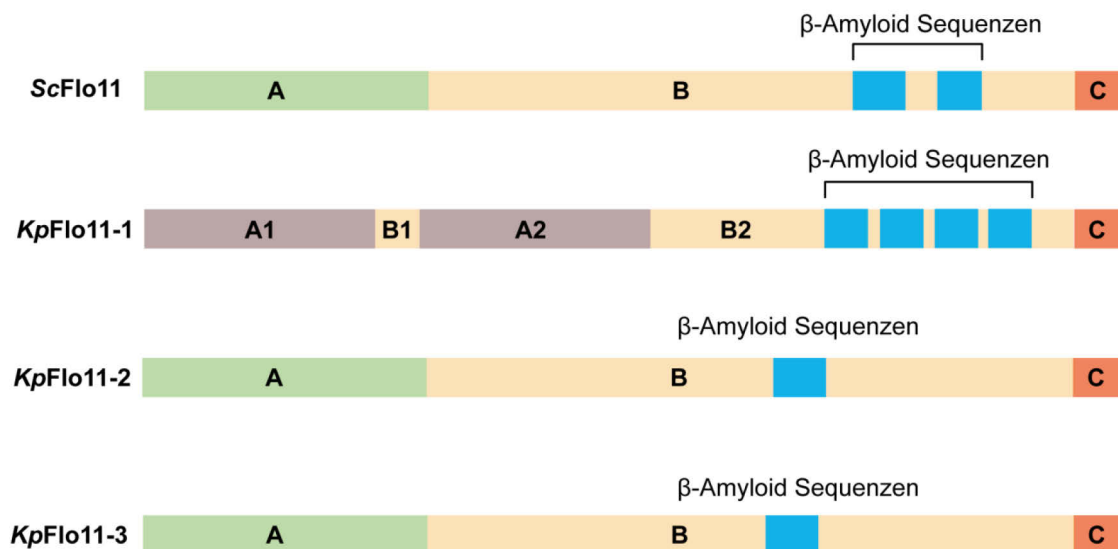
Flo11 Molekül	$\beta$ -Aggregation Sequenz	% $\beta$ -Aggregation
<b>ScFlo11</b>	VTTVVSTTV	77
	ITTFV	56
	FMWLLLA	85
<b>KpFlo11-1</b>	VITGV	30
	TVVVV	90
	SVATIVTGV	57
	AVALLFNALF	78
<b>KpFlo11-2</b>	IYVSSATWV	52
<b>KpFlo11-3</b>	IYVTSATWVR	81

Für ScFlo11 wurden drei Sequenzen gefunden, für KpFlo11 vier Sequenzen und für KpFlo11-2 und KpFlo11-3 jeweils eine Sequenz, die eine Wahrschein-

lichkeit von mehr als 30 % für die Bildung von  $\beta$ -Amyloid-Strukturen aufweisen. In der Vorhersage von Ramsook *et al.* von 2009 wurden für ScFlo11 die Sequenzen VVSTTV, VTTAVT und TTVV vorhergesagt<sup>48</sup>. *In vitro* Analysen unterstützen eine Bildung von  $\beta$ -Amyloid-artigen Strukturen bei ScFlo11<sup>48</sup>.

Daher ist es durchaus wahrscheinlich, dass auch KpFlo11-1, KpFlo11-2, KpFlo11-3 und ScFlo11, in der Lage sind, solche  $\beta$ -Amyloide potentiell auszubilden.

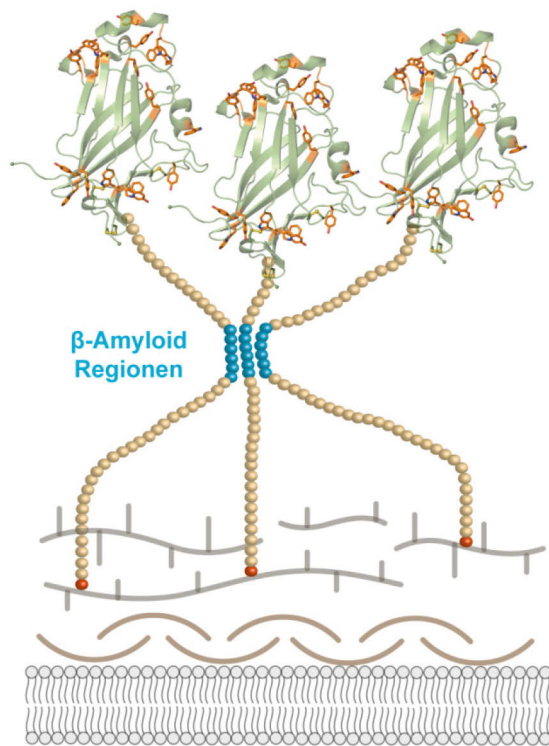
Die vorhergesagten Sequenzen befinden sich bei beiden Flo11 Adhäsinen eher in der Nähe der C-Domänen und sind deutlich von den A-Domänen getrennt (Abbildung 87).



**Abbildung 87** Lokalisation der Amyloid-bildenden Sequenzen in ScFlo11, KpFlo11-1, KpFlo11-2 und KpFlo11-3. Die Proteine sind in A-, B- und C-Domänen aufgeteilt und die Amyloid-bildenden Sequenzen in blau dargestellt.

Durch  $\beta$ -Aggregation der B-Domänen nahe der C-Domänen könnten die A-Domänen gebündelt werden, aber dennoch einen gewissen Freiheitsgrad an Flexibilität aufweisen.

Um den Einfluss der B-Domänen und den  $\beta$ -Amyloid-Strukturen zu berücksichtigen, wurde das Modell der Flo11-Flo11 Interaktion dahingehend ergänzt (Abbildung 88). Die Bildung von Multimeren auf der Hefezelloberfläche erhöht die Avidität der Adhäsine durch eine lokale Erhöhung der Adhäsinkonzentration. Besonders im Fall von Flo11 könnte dies die Hydrophobizität der



**Abbildung 88 Modell für die Bildung von Multi-meren durch  $\beta$ -Aggregation.** Die  $\beta$ -Amyloid bildenden Sequenzen sind in blau dargestellt. Abgewandelt nach Ramsook *et al.*<sup>44</sup>

über 50 % für das Auftreten von  $\beta$ -Amyloid-Strukturen. Ein Clustern der Flo11 Moleküle auf der Zelloberfläche würde auch im Einklang mit den FIB-SEM Aufnahmen stehen.

Zelloberfläche nochmal steigern. Die Bündelung hat aber auch Einfluss auf die Kinetik der Bindungen. So erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass eine Flo11A Domäne nach Dissoziation von einer anderen A-Domäne schnellstmöglich wieder an eine andere A-Domäne binden kann. Als Ergebnis davon würde sich die Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ) verringern und eine kleinere Dissoziationskonstante  $K_D$  entstünde<sup>53, 298</sup>. Die Ausbildung von  $\beta$ -Amyloid-Strukturen scheint in Bezug auf die Flo11-Flo11 Interaktion realistisch zu sein, da so die Hydrophobizität deutlich erhöht werden kann. Zudem zeigen alle vier untersuchten Flo11 B-Domänen eine Wahrscheinlichkeit

## 5.5 Ausblick

*Saccharomyces cerevisiae* verfügt über eine Familie von GPI-verankerten Zellwandproteinen für die Interaktion mit der Umgebung. Das Flokkulin Flo11 ist ein Hauptvertreter dieser pilzlichen Adhäsine und an der Ausbildung verschiedener Phänotypen beteiligt, wie Biofilme, Flors oder Filamente. Die Kristallstruktur zusammen mit den pH abhängigen Bindungsdaten hat erheblich zur Aufklärung des Flo11A-Flo11A Interaktionsmechanismus beigetragen. Dabei ist es auf molekularer Ebene nicht gänzlich geklärt, wie hydrophobe Interaktionen, besonders über größere Distanzen, stattfinden können.

Hochauflösende mikroskopische Methoden (EM, TEM) könnten dazu beitragen, die in den Rekonstruktionen der Kristallpackungen beobachteten Interaktionen

*in vivo* zu verifizieren. Hochaufgelöste Strukturen der Flo11A-Flo11A Interaktion *in vivo* könnten sowohl das Modell der Interaktion über die aromatischen Bänder, als auch die Existenz von  $\beta$ -Amyloiden in den B Domänen beweisen.

Neben den aromatischen Bändern zeigten die Flo11A Domänen auch das Vorhandensein von sauren Resten, welche um die aromatischen Reste gruppieren. Diese wurden für die starke pH-Abhängigkeit verantwortlich gemacht. Anders als die aromatischen Reste, wurden hier noch keine Mutationsstudien durchgeführt. So könnte eventuell versucht werden, dieses Modell der pH-abhängigen Flo11A-Flo11A Interaktion zu bestätigen, indem die Aspartat und Glutamat Reste durch Asparagin respektive Glutamin schrittweise ausgetauscht würden. So könnte vielleicht eine Flo11A Variante erschaffen werden, deren pH-abhängige Bindung etwas in den basischen Bereich verschoben würde. Ferner könnte geklärt werden, ob analog zu den aromatischen Resten, Punktmutationen hier einen Einfluss haben oder dies keinen Effekt hat, da möglicherweise die Gesamtladung entscheidend ist.

In dieser Arbeit konnte eine weitere Flo11A Struktur aus *Komagataella pastoris* aufgeklärt werden, wodurch ein Einblick in die Diversität der Flo11-Typ Adhäsine möglich war. So scheint der strukturellen Anordnung der aromatischen Reste eine Rolle zuzukommen bei der Diskriminierung zwischen homophilen und heterophilen Interaktionen. Allerdings sind der exakte Mechanismus der Unterscheidung, sowie auch die Interaktionen mit Oberflächen, noch nicht in Gänze verstanden. Die kinetische Analyse der Biacore Daten ergab, dass die heterophile Interaktion hauptsächlich in der Assoziation beeinträchtigt ist gegenüber der homophilen Interaktion. Auf dieser Grundlage könnten Biacore Experimente mit weiteren A-Domänen aus der Flo11 Familie helfen, diese Beobachtungen zu untermauern. Auch die Aufklärung der Kristallstruktur weiterer Vertreter der Flo11A Familie könnte dazu beitragen, die Spezifität der Interaktionen weiter zu analysieren. So könnte der Frage nachgegangen werden, inwiefern die Flo11A Domäne zwischen näher und entfernter verwandten Varianten unterscheiden kann. In diesem Zusammenhang wäre es interessant,  $K_D$  Werte und pH Abhängigkeiten verschiedener Flo11A Varianten nebeneinander zu stellen und zu vergleichen.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf den A-Domänen der Flo11 Proteine. Um ein vollständiges Bild der Flo11 vermittelten Interaktion zu bekommen, muss allerdings der Einfluss der B-Domänen ebenfalls berücksichtigt werden. Es wurde bereits gezeigt, dass die B-Domänen ein hohes Potential für die Ausbildung von  $\beta$ -Amyloid-Strukturen besitzen können. Es wurde ebenfalls postuliert, dass die B-Domänen Calcium binden können und dadurch eine rigidere Konformation einnehmen können für eine stabile Präsentation der A-Domäne auf der Zelloberfläche<sup>48</sup>. Zusätzlich könnten die B-Domänen, dadurch, dass sie hochglykosyliert sind, zur hydrophoben Interaktion beitragen. Eine PCR Analyse von verschiedenen Flor-Hefestämmen hat zudem gezeigt, dass *FLO11* sehr polymorph in der Länge ist mit Variationen von 3,0 bis 6,1 kb<sup>299</sup>. Darüber hinaus korreliert das Gewicht des Biofilms mit der Genlänge<sup>98, 299</sup>.

Die Flo11A Domäne könnte zusammen mit mehreren Repeats der B-Domäne in Hefeexpressionssystemen produziert und aufgereinigt werden. Das Glykosylierungsmuster könnte anschließend massenspektroskopisch und mit Deglykosylierungs-Assays näher analysiert werden. Zusätzlich könnten Bindungsassays mittels ITC Aufschluss darüber geben, ob Calcium gebunden werden kann oder nicht. Mögliche konformationelle Änderungen durch die Bindung von Calcium könnten über CD Spektroskopie ermittelt werden. Sollte eine Stabähnliche Konformation nach Calcium-Bindung erfolgen, so sollte diese Änderung im FernUV CD-Spektrum verfolgt werden können. Sollte es nicht möglich sein, die glykosylierten bzw. deglykosylierten Flo11AB Domänen zu kristallisieren, könnten eventuell SAXS Experimente helfen, die Form und die Calcium-Abhängigkeit zu untersuchen. Zudem könnten Einblicke erhalten werden in den Übergang von der A- zur B-Domäne.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Hibbett, D.S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* **111**, 509-547 (2007).
2. Fungi - Biology and Applications, Edn. second edition. (Wiley-Blackwell, 2012).
3. Walker, K., Skelton, H. & Smith, K. Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*. *J. Cutan. Pathol.* **29**, 616-618 (2002).
4. Crabtree, H.G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* **23**, 536-545 (1929).
5. Neiman, A.M. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 565-+ (2005).
6. Goffeau, A. et al. Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546-& (1996).
7. Buijs, N.A., Siewers, V. & Nielsen, J. Advanced biofuel production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 480-488 (2013).
8. Daly, R. & Hearn, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* **18**, 119-138 (2005).
9. Yamada, Y., Matsuda, I., Maeda, K. & Mikata, K. The Phylogenetic-Relationships of Methanol-Assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18s and 26s Ribosomal-Rnas - the Proposal of *Komagataella* Gen-Nov (*Saccharomycetaceae*). *Biosci Biotech Bioch* **59**, 439-444 (1995).
10. Kurtzman, C.P. Three new ascomycetous yeasts from insect-associated arboreal habitats. *Can. J. Microbiol.* **46**, 50-58 (2000).
11. Dlauchy, D., Tornai-Lehocski, J., Fulop, L. & Peter, G. *Pichia* (*Komagataella*) *pseudopastoris* sp nov., a new yeast species from Hungary. *Anton Leeuw Int J G* **83**, 327-332 (2003).
12. Phaff, H.J. & Knapp, E.P. The taxonomy of yeasts found in exudates of certain trees and other natural breeding sites of some species of *Drosophila*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **22**, 117-130 (1956).
13. De Schutter, K. et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* **27**, 561-U104 (2009).
14. Bretthauer, R.K. & Castellino, F.J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 193-200 (1999).

15. Gow, N.A.R., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J.P. & Netea, M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* **10**, 112-122 (2012).
16. Klis, F.M. Cell-Wall Assembly in Yeast. *Yeast* **10**, 851-869 (1994).
17. Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239-256 (2002).
18. Bartnick.S Cell Wall Chemistry Morphogenesis and Taxonomy of Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **22**, 87-& (1968).
19. de Nobel, H., van den Ende, H. & Klis, F.M. Cell wall maintenance in fungi. *Trends Microbiol.* **8**, 344-345 (2000).
20. Bago, B. et al. Effect of Nikkomycin Z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular-mycorrhizal fungi. *Protoplasma* **192**, 80-92 (1996).
21. Specht, C.A. et al. The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet. Biol.* **20**, 153-167 (1996).
22. Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H. & Klis, F.M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Bba-Gen Subjects* **1426**, 373-383 (1999).
23. Bernard, M. & Latge, J.P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med. Mycol.* **39**, 9-17 (2001).
24. Grun, C.H. et al. The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiology* **15**, 245-257 (2005).
25. Klis, F.M., De Groot, P. & Hellingwerf, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **39**, 1-8 (2001).
26. Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A. & Silverman, S.J. Fungal Cell-Wall Synthesis - the Construction of a Biological Structure. *Microbiol. Sci.* **5**, 370-375 (1988).
27. Kollar, R. et al. Architecture of the yeast cell wall - beta(1->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* **272**, 17762-17775 (1997).
28. Brown, J.A. & Catley, B.J. Monitoring Polysaccharide Synthesis in *Candida-Albicans*. *Carbohydr. Res.* **227**, 195-202 (1992).
29. Bowman, S.M., Piwowar, A., Al Dabbous, M., Vierula, J. & Free, S.J. Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **5**, 587-600 (2006).



30. Wosten, H.A.B. & Scholtmeijer, K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1587-1597 (2015).
31. Linder, M.B., Szilvay, G.R., Nakari-Setälä, T. & Penttilä, M.E. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 877-896 (2005).
32. Scholtmeijer, K. et al. The use of hydrophobins to functionalize surfaces. *Biomed. Mater. Eng.* **14**, 447-454 (2004).
33. Verstrepen, K.J. & Klis, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* **60**, 5-15 (2006).
34. Kojic, E.M. & Darouiche, R.O. Candida infections of medical devices. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 255-+ (2004).
35. Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H. & Delvaux, F.R. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 197-205 (2003).
36. Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P. & Blondin, B. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J. Bacteriol.* **179**, 4929-4936 (1997).
37. Stratford, M. Yeast Flocculation - a New Perspective. *Adv. Microb. Physiol.* **33**, 1-71 (1992).
38. Stratford, M. Evidence for 2 Mechanisms of Flocculation in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Yeast* **5**, 441-445 (1989).
39. Smukalla, S. et al. FLO1 Is a Variable Green Beard Gene that Drives Biofilm-like Cooperation in Budding Yeast. *Cell* **135**, 726-737 (2008).
40. Hoyer, L.L., Payne, T.L. & Hecht, J.E. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of ALS proteins to the fungal cell surface. *J. Bacteriol.* **180**, 5334-5343 (1998).
41. Latgé, J.P. Tasting the fungal cell wall. *Cell. Microbiol.* **12**, 863-872 (2010).
42. Pittet, M. & Conzelmann, A. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bba-Mol Cell Biol L* **1771**, 405-420 (2007).
43. Caras, I.W., Weddell, G.N., Davitz, M.A., Nussenzweig, V. & Martin, D.W. Signal for Attachment of a Phospholipid Membrane Anchor in Decay Accelerating Factor. *Science* **238**, 1280-1283 (1987).
44. Gerber, L.D., Kodukula, K. & Udenfriend, S. Phosphatidylinositol Glycan (Pi-G) Anchored Membrane-Proteins - Amino-Acid-Requirements Adjacent to the Site of Cleavage and Pi-G Attachment in the CooH-Terminal Signal Peptide. *J. Biol. Chem.* **267**, 12168-12173 (1992).

45. Moran, P. & Caras, I.W. Fusion of Sequence Elements from Nonanchored Proteins to Generate a Fully Functional Signal for Glycophosphatidylinositol Membrane Anchor Attachment. *J. Cell Biol.* **115**, 1595-1600 (1991).
46. Nuoffer, C., Horvath, A. & Riezman, H. Analysis of the Sequence Requirements for Glycosylphosphatidylinositol Anchoring of *Saccharomyces-Cerevisiae* Gas1 Protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 10558-10563 (1993).
47. Lu, C.F. et al. Glycosyl Phosphatidylinositol-Dependent Cross-Linking of Alpha-Agglutinin and Beta-1,6-Glucan in the *Saccharomyces-Cerevisiae* Cell-Wall. *J. Cell Biol.* **128**, 333-340 (1995).
48. Ramsook, C.B. et al. Yeast Cell Adhesion Molecules Have Functional Amyloid-Forming Sequences. *Eukaryot Cell* **9**, 393-404 (2010).
49. Veelders, M. et al. Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 22511-22516 (2010).
50. Dwek, R.A. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chem. Rev.* **96**, 683-720 (1996).
51. Lis, H. & Sharon, N. Protein Glycosylation - Structural and Functional-Aspects. *Eur. J. Biochem.* **218**, 1-27 (1993).
52. Maestre-Reyna, M. et al. Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16864-16869 (2012).
53. Dranginis, A.M., Rauceo, J.M., Coronado, J.E. & Lipke, P.N. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 282-294 (2007).
54. Sato, M., Maeba, H., Watari, J. & Takashio, M. Analysis of an inactivated Lg-FLO1 gene present in bottom-fermenting yeast. *J Biosci Bioeng* **93**, 395-398 (2002).
55. Kang, S. & Choi, H. Effect of surface hydrophobicity on the adhesion of *S-cerevisiae* onto modified surfaces by poly(styrene-ran-sulfonic acid) random copolymers. *Colloid Surface B* **46**, 70-77 (2005).
56. Klotz, S.A. et al. Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. *Infect. Immun.* **72**, 2029-2034 (2004).
57. Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q.H. & Fink, G.R. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12158-12163 (2000).
58. Beaussart, A. et al. Quantifying the forces guiding microbial cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Nat. Protoc.* **9**, 1049-1055 (2014).

59. Garrett, T.R., Bhakoo, M. & Zhang, Z.B. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci* **18**, 1049-1056 (2008).
60. Boks, N.P., Norde, W., van der Mei, H.C. & Busscher, H.J. Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiol-Sgm* **154**, 3122-3133 (2008).
61. Ong, Y.L., Razatos, A., Georgiou, G. & Sharma, M.M. Adhesion forces between E-coli bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir* **15**, 2719-2725 (1999).
62. Chang, Y.I. & Chang, P.K. The role of hydration force on the stability of the suspension of *Saccharomyces cerevisiae*-application of the extended DLVO theory. *Colloid Surface A* **211**, 67-77 (2002).
63. Potthoff, E. et al. Rapid and Serial Quantification of Adhesion Forces of Yeast and Mammalian Cells. *PLoS One* **7** (2012).
64. Chakrabarti, P. & Bhattacharyya, R. Geometry of nonbonded interactions involving planar groups in proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **95**, 83-137 (2007).
65. Krasowska, A. & Sigler, K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Mi* **4** (2014).
66. Hazen, K.C., Wu, J.G. & Masuoka, J. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect. Immun.* **69**, 779-786 (2001).
67. Giaouris, E., Chapot-Chartier, M.P. & Briandet, R. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Int. J. Food Microbiol.* **131**, 2-9 (2009).
68. Kochkodan, V., Tsarenko, S., Potapchenko, N., Kosinova, V. & Goncharuk, V. Adhesion of microorganisms to polymer membranes: a photobactericidal effect of surface treatment with TiO<sub>2</sub>. *Desalination* **220**, 380-385 (2008).
69. Lo, W.S. & Dranginis, A.M. FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J. Bacteriol.* **178**, 7144-7151 (1996).
70. De las Penas, A. et al. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev.* **17**, 2245-2258 (2003).
71. Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C. & Fink, G.R. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116**, 405-415 (2004).

72. Teunissen, A.W.R.H. & Steensma, H.Y. Review - the Dominant Flocculation Genes of *Saccharomyces-Cerevisiae* Constitute a New Subtelomeric Gene Family. *Yeast* **11**, 1001-1013 (1995).
73. Teunissen, A.W.R.H., Vandenberg, J.A. & Steensma, H.Y. Localization of the Dominant Flocculation Genes Flo5 and Flo8 of *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Yeast* **11**, 735-745 (1995).
74. Verstrepen, K.J., Jansen, A., Lewitter, F. & Fink, G.R. Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat. Genet.* **37**, 986-990 (2005).
75. Verstrepen, K.J., Reynolds, T.B. & Fink, G.R. Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol* **2**, 533-540 (2004).
76. Caro, L.H.P. et al. In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1477-1489 (1997).
77. Bayly, J.C., Douglas, L.M., Pretorius, I.S., Bauer, F.F. & Dranginis, A.M. Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Res* **5**, 1151-1156 (2005).
78. Bruckner, S. & Mosch, H.U. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 25-58 (2012).
79. Van Mulders, S.E. et al. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Res* **9**, 178-190 (2009).
80. Jin, Y.L., Ritcey, L.L., Speers, R.A. & Dolphin, P.J. Effect of cell surface hydrophobicity, charge, and zymoelectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Soc Brew Chem* **59**, 1-9 (2001).
81. Masy, C.L., Henquinet, A. & Mestdagh, M.M. Flocculation of *Saccharomyces-Cerevisiae* - Inhibition by Sugars. *Can. J. Microbiol.* **38**, 1298-1306 (1992).
82. Smit, G., Straver, M.H., Lugtenberg, B.J.J. & Kijne, J.W. Flocculence of *Saccharomyces-Cerevisiae* Cells Is Induced by Nutrient Limitation, with Cell-Surface Hydrophobicity as a Major Determinant. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3709-3714 (1992).
83. Dos Santos, A.M., Feuillat, M. & Charpentier, C. Flor yeast metabolism in a model system similar to cellar ageing of the French "Vin Jaune": Evolution of some by-products, nitrogen compounds and polysaccharides. *Vitis* **39**, 129-134 (2000).
84. Freiberg, K.J. & Cruess, W.V. A Study of Certain Factors Affecting the Growth of Flor Yeast. *Appl. Microbiol.* **3**, 208-212 (1955).

85. Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M. & Imura, Y. FLO11 is the primary factor in flor formation caused by cell surface Hydrophobicity in wild-type flor yeast. *Biosci Biotech Bioch* **70**, 660-666 (2006).
86. Moreno-Garcia, J., Garcia-Martinez, T., Millan, M.C., Mauricio, J.C. & Moreno, J. Proteins involved in wine aroma compounds metabolism by a *Saccharomyces cerevisiae* flor-velum yeast strain grown in two conditions. *Food Microbiol* **51**, 1-9 (2015).
87. Luthi, H.R., Stoyla, B. & Moyer, J.C. Continuous Production of Flor Sherry from New York State Wines. *Appl. Microbiol.* **13**, 511-& (1965).
88. Ough, C.S. & Amerine, M.A. Flor Sherry Production by Submerged Culture. *Food Technol-Chicago* **14**, 155-159 (1960).
89. Cortes, M.B., Moreno, J.J., Zea, L., Moyano, L. & Medina, M. Response of the aroma fraction in sherry wines subjected to accelerated biological aging. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3297-3302 (1999).
90. Zara, S., Gross, M.K., Zara, G., Budroni, M. & Bakalinsky, A.T. Ethanol-Independent Biofilm Formation by a Flor Wine Yeast Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4089-4091 (2010).
91. Berlanga, T.M., Atanasio, C., Mauricio, J.C. & Ortega, J.M. Influence of aeration on the physiological activity of flor yeasts. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3378-3384 (2001).
92. Peinado, R.A., Moreno, J., Medina, M. & Mauricio, J.C. Changes in volatile compounds and aromatic series in sherry wine with high gluconic acid levels subjected to aging by submerged flor yeast cultures. *Biotechnol. Lett.* **26**, 757-762 (2004).
93. Imura, Y., Hara, S. & Otsuka, K.I. Studies on Film Yeasts of Wine .2. Cell-Surface Hydrophobicity as a Pellicle Formation Factor in Film Strain of *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1215-1222 (1980).
94. Martinez, P., Rodriguez, L.P. & Benitez, T. Velum formation by flor yeasts isolated from sherry wine. *Am J Enol Viticult* **48**, 55-62 (1997).
95. Mortensen, H.D., Dupont, K., Jespersen, L., Willats, W.G. & Arneborg, N. Identification of amino acids involved in the Flo11p-mediated adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to a polystyrene surface using phage display with competitive elution. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 1041-1047 (2007).
96. Purevdorj-Gage, B., Orr, M.E., Stoodley, P., Sheehan, K.B. & Hyman, L.E. The role of *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae* biofilm development in a laboratory based flow-cell system. *Fems Yeast Res* **7**, 372-379 (2007).
97. Fidalgo, M., Barrales, R.R., Ibeas, J.I. & Jimenez, J. Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11228-11233 (2006).

98. Fidalgo, M., Barrales, R.R. & Jimenez, J. Coding repeat instability in the FLO11 gene of *Saccharomyces* yeasts. *Yeast* **25**, 879-889 (2008).
99. Gow, N.A.R. Growth and Guidance of the Fungal Hypha. *Microbiol-Sgm* **140**, 3193-3205 (1994).
100. Gimeno, C.J. & Fink, G.R. The Logic of Cell-Division in the Life-Cycle of Yeast. *Science* **257**, 626-626 (1992).
101. Kron, S.J. & Gow, N.A.R. Budding Yeast Morphogenesis - Signaling, Cytoskeleton and Cell-Cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 845-855 (1995).
102. Lambrechts, M.G., Bauer, F.F., Marmur, J. & Pretorius, I.S. Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8419-8424 (1996).
103. Monds, R.D. & O'Toole, G.A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* **17**, 73-87 (2009).
104. Blankenship, J.R. & Mitchell, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 588-594 (2006).
105. Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C. & Lopez-Ribot, J. Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* **35**, 340-355 (2009).
106. Verstraeten, N. et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* **16**, 496-506 (2008).
107. Reynolds, T.B. & Fink, G.R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**, 878-881 (2001).
108. Roberts, R.L. & Fink, G.R. Elements of a Single Map Kinase Cascade in *Saccharomyces-Cerevisiae* Mediate 2 Developmental Programs in the Same Cell-Type - Mating and Invasive Growth. *Genes Dev.* **8**, 2974-2985 (1994).
109. Andersen, K.S. et al. Genetic Basis for *Saccharomyces cerevisiae* Biofilm in Liquid Medium. *G3-Genes Genom Genet* **4**, 1671-1680 (2014).
110. Bojsen, R.K., Andersen, K.S. & Regenber, B. *Saccharomyces cerevisiae* - a model to uncover molecular mechanisms for yeast biofilm biology. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 169-182 (2012).
111. Karunanithi, S. et al. Shedding of the Mucin-Like Flocculin Flo11p Reveals a New Aspect of Fungal Adhesion Regulation. *Curr. Biol.* **20**, 1389-1395 (2010).
112. Beauvais, A., Loussert, C., Prevost, M.C., Verstrepen, K. & Latge, J.P. Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in FLO1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Fems Yeast Res* **9**, 411-419 (2009).

113. Granek, J.A., Kayikci, O. & Magwene, P.M. Pleiotropic signaling pathways orchestrate yeast development. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 676-681 (2011).
114. Rupp, S., Summers, E., Lo, H.J., Madhani, H. & Fink, G. MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO J.* **18**, 1257-1269 (1999).
115. Voordeckers, K. et al. Identification of a complex genetic network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology. *Mol. Microbiol.* **86**, 225-239 (2012).
116. Douglas, L.M., Li, L., Yang, Y. & Dranginis, A.M. Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion. *Eukaryot Cell* **6**, 2214-2221 (2007).
117. Untergasser, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* **35**, W71-W74 (2007).
118. Geng, L.A., Xin, W., Huang, D.W. & Feng, G. A universal cloning vector using vaccinia topoisomerase I. *Mol. Biotechnol.* **33**, 23-28 (2006).
119. Morham, S.G. & Shuman, S. Covalent and Noncovalent DNA-Binding by Mutants of Vaccinia DNA Topoisomerase-I. *J. Biol. Chem.* **267**, 15984-15992 (1992).
120. Sekiguchi, J. & Shuman, S. Proteolytic Footprinting of Vaccinia Topoisomerase Bound to DNA. *J. Biol. Chem.* **270**, 11636-11645 (1995).
121. Studier, F.W. & Moffatt, B.A. Use of Bacteriophage-T7 Rna-Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130 (1986).
122. Dubendorff, J.W. & Studier, F.W. Controlling Basal Expression in an Inducible T7 Expression System by Blocking the Target T7 Promoter with Lac Repressor. *J. Mol. Biol.* **219**, 45-59 (1991).
123. Veelders, M. (Philipps-Universität Marburg, 2012).
124. Taylor, R.G., Walker, D.C. & McInnes, R.R. *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1677-1678 (1993).
125. Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J. & Georgiou, G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13703-13708 (1999).
126. DeLisa, M.P., Tullman, D. & Georgiou, G. Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6115-6120 (2003).

127. Chen, J. et al. Chaperone activity of DsbC. *J. Biol. Chem.* **274**, 19601-19605 (1999).
128. Mattanovich, D. et al. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories* **8**, 29 (2009).
129. Cregg, J.M. Introduction: distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems. *Methods Mol. Biol.* **389**, 1-10 (2007).
130. Braus, G.H., Grundmann, O., Bruckner, S. & Mosch, H.U. Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and FLO11 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4272-4284 (2003).
131. Bertani, G. Studies on Lysogenesis .1. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia-Coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293-300 (1951).
132. Murthy, M.S.S., Rao, B.S., Reddy, N.M.S., Subrahmanyam, P. & Madhvanath, U. Non-Equivalence of Yepd and Synthetic Complete Media in Yeast Reversion Studies. *Mutat. Res.* **27**, 219-223 (1975).
133. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria - Genetic Transformation of *Escherichia-Coli* by R-Factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2110-& (1972).
134. Mandel, M. & Higa, A. Calcium-Dependent Bacteriophage DNA Infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-& (1970).
135. Schmitt, M.E., Brown, T.A. & Trumpower, B.L. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3091-3092 (1990).
136. Mullis, K.B. & Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350 (1987).
137. McInerney, P., Adams, P. & Hadi, M.Z. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Mol. Biol. Int.* **2014**, 287430 (2014).
138. Kibbe, W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**, W43-W46 (2007).
139. Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H. & Marky, L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 3746-3750 (1986).
140. Sugimoto, N., Nakano, S., Yoneyama, M. & Honda, K. Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4501-4505 (1996).
141. Real-Time PCR Applications Guide (Biorad). (2006).



142. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
143. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. *Nature* **258**, 598-599 (1975).
144. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-& (1970).
145. Gill, S.C. & Vonhippel, P.H. Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino-Acid Sequence Data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326 (1989).
146. Hubert Rehm, T.L. Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. (Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage 2009).
147. Bioanalytik. (Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage 2006).
148. Jonsson, U. et al. Real-Time Biospecific Interaction Analysis Using Surface-Plasmon Resonance and a Sensor Chip Technology. *Biotechniques* **11**, 620-& (1991).
149. Homola, J., Yee, S.S. & Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensor Actuat B-Chem* **54**, 3-15 (1999).
150. Biacore T100 Software Handbook. (Biacore, Februar 2006).
151. Park, C. & Raines, R.T. Dimer formation by a "monomeric" protein. *Protein Sci.* **9**, 2026-2033 (2000).
152. Kelly, S.M. & Price, N.C. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr Protein Pept Sc* **1**, 349-384 (2000).
153. Essen, L.O., Marahiel, M. A. Biochemisches Praktikum Für Studierende im Master-Studiengang Chemie und Biologie. (2010).
154. Kendrew, J.C. et al. 3-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature* **181**, 662-666 (1958).
155. Berman, H.M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235-242 (2000).
156. Berman, H., Henrick, K. & Nakamura, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 980-980 (2003).
157. Newman, J. et al. Towards rationalization of crystallization screening for small- to medium-sized academic laboratories: the PACT/JCSG plus strategy. *Acta Crystallogr D* **61**, 1426-1431 (2005).

158. Page, R. et al. Shotgun crystallization strategy for structural genomics: an optimized two-tiered crystallization screen against the *Thermotoga maritima* proteome. *Acta Crystallogr D* **59**, 1028-1037 (2003).
159. Lesley, S.A. & Wilson, I.A. Protein production and crystallization at the joint center for structural genomics. *Journal of structural and functional genomics* **6**, 71-79 (2005).
160. Jancarik, J. & Kim, S.H. Sparse-Matrix Sampling - a Screening Method for Crystallization of Proteins. *J Appl Crystallogr* **24**, 409-411 (1991).
161. Rupp, B. Origin and use of crystallization phase diagrams. *Acta Crystallogr F* **71**, 247-260 (2015).
162. Dessau, M.A. & Modis, Y. Protein Crystallization for X-ray Crystallography. *Jove-J Vis Exp* (2011).
163. Hackert, M.L. et al. Crystallization and Subunit Structure of Histidine-Decarboxylase from *Lactobacillus-30a*. *J. Biol. Chem.* **256**, 687-690 (1981).
164. Bergfors, T. Seeds to crystals. *J. Struct. Biol.* **142**, 66-76 (2003).
165. Stura, E.A. & Wilson, I.A. Applications of the Streak Seeding Technique in Protein Crystallization. *J Cryst Growth* **110**, 270-282 (1991).
166. D'Arcy, A., Mac Sweeney, A. & Haber, A. Using natural seeding material to generate nucleation in protein crystallization experiments. *Acta Crystallogr D* **59**, 1343-1346 (2003).
167. Luft, J.R. et al. Efficient optimization of crystallization conditions by manipulation of drop volume ratio and temperature. *Protein Sci.* **16**, 715-722 (2007).
168. Saridakis, E. & Chayen, N.E. Improving protein crystal quality by decoupling nucleation and growth in vapor diffusion. *Protein Sci.* **9**, 755-757 (2000).
169. Garman, E.F. & Mitchell, E.P. Glycerol concentrations required for cryoprotection of 50 typical protein crystallization solutions. *J Appl Crystallogr* **29**, 584-587 (1996).
170. Battye, T.G.G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H.R. & Leslie, A.G.W. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D* **67**, 271-281 (2011).
171. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125-132 (1993).
172. Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D* **62**, 72-82 (2006).

173. CCP4 The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760-763 (1994).
174. Evans, P.R. & Murshudov, G.N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D* **69**, 1204-1214 (2013).
175. Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z. & Jaskolski, M. Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *Febs J* **280**, 5705-5736 (2013).
176. Taylor, G. The phase problem. *Acta Crystallogr D* **59**, 1881-1890 (2003).
177. Huber, R. Die Automatisierte Faltmolekulmethode. *Acta Crystallogr.* **19**, 353-& (1965).
178. Abergel, C. Molecular replacement: tricks and treats. *Acta Crystallogr D* **69**, 2167-2173 (2013).
179. Patterson, A.L. A direct method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Z Kristallogr* **90**, 517-542 (1935).
180. Sali, A. & Blundell, T.L. Comparative Protein Modeling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815 (1993).
181. McCoy, A.J. et al. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674 (2007).
182. Adams, P.D. et al. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1948-1954 (2002).
183. Terwilliger, T.C. et al. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr D* **64**, 61-69 (2008).
184. Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240-255 (1997).
185. Afonine, P.V. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D* **68**, 352-367 (2012).
186. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486-501 (2010).
187. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W. & Thornton, J.M. Validation of protein models derived from experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 631-639 (1998).

188. Morris, A.L., Macarthur, M.W., Hutchinson, E.G. & Thornton, J.M. Stereochemical Quality of Protein-Structure Coordinates. *Proteins-Structure Function and Genetics* **12**, 345-364 (1992).
189. Brunger, A.T. Free R-Value - a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal-Structures. *Nature* **355**, 472-475 (1992).
190. DeLano, W.L. (DeLano Scientific LLC, <http://www.pymol.org>, San Carlos, CA, USA; 2002).
191. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10037-10041 (2001).
192. Kikhney, A.G. & Svergun, D.I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett.* **589**, 2570-2577 (2015).
193. Guinier, A. A dispositive permitting the obtention of diffraction diagrams of intense crystalline powders with monochromatic radiation. *Cr Hebd Acad Sci* **204**, 1115-1116 (1937).
194. Putnam, D.K., Lowe, E.W., Jr. & Meiler, J. Reconstruction of SAXS Profiles from Protein Structures. *Computational and structural biotechnology journal* **8**, e201308006 (2013).
195. Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L. & Tainer, J.A. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.* **40**, 191-285 (2007).
196. Pernot, P. et al. Upgraded ESRF BM29 beamline for SAXS on macromolecules in solution. *J Synchrotron Radiat* **20**, 660-664 (2013).
197. Round, A. et al. BioSAXS Sample Changer: a robotic sample changer for rapid and reliable high-throughput X-ray solution scattering experiments. *Acta Crystallogr D* **71**, 67-75 (2015).
198. Petoukhov, M.V., Konarev, P.V., Kikhney, A.G. & Svergun, D.I. ATSAS 2.1 - towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* **40**, S223-S228 (2007).
199. Franke, D. & Svergun, D.I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* **42**, 342-346 (2009).
200. Zhang, L. et al. Screening for Glycosylphosphatidylinositol-Modified Cell Wall Proteins in *Pichia pastoris* and Their Recombinant Expression on the Cell Surface. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5519-5526 (2013).
201. Bairoch, A. et al. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **33**, D154-D159 (2005).

202. Gasteiger, E. et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3784-3788 (2003).
203. Sievers, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7** (2011).
204. Finn, R.D. et al. Pfam: the protein families database. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **42**, D222-230 (2014).
205. Veelders, M. (Philipps-Universität Marburg, 2012).
206. Koide, A., Bailey, C.W., Huang, X. & Koide, S. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J. Mol. Biol.* **284**, 1141-1151 (1998).
207. McWilliam, H. et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **41**, W597-600 (2013).
208. Ohgushi, M. & Wada, A. Molten-Globule State - a Compact Form of Globular-Proteins with Mobile Side-Chains. *FEBS Lett.* **164**, 21-24 (1983).
209. Jaremko, M. et al. Cold denaturation of a protein dimer monitored at atomic resolution. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 264-270 (2013).
210. Goossens, K.V. & Willaert, R.G. The N-terminal domain of the Flo11 protein from *Saccharomyces cerevisiae* is an adhesin without mannose-binding activity. *Fems Yeast Res* **12**, 78-87 (2012).
211. Reynolds, T.B., Jansen, A., Peng, X. & Fink, G.R. Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryot Cell* **7**, 122-130 (2008).
212. Anandakrishnan, R., Aguilar, B. & Onufriev, A.V. H++3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Res.* **40**, W537-W541 (2012).
213. Amory, D.E. & Rouxhet, P.G. Surface-Properties of *Saccharomyces-Cerevisiae* and *Saccharomyces-Carlsbergensis* - Chemical-Composition, Electrostatic Charge and Hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta* **938**, 61-70 (1988).
214. Svergun, D.I. Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *J Appl Crystallogr* **25**, 495-503 (1992).
215. Hura, G.L. et al. Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS). *Nat Methods* **6**, 606-U683 (2009).
216. Mertens, H.D.T. & Svergun, D.I. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J. Struct. Biol.* **172**, 128-141 (2010).

217. Case, D.A. et al. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668-1688 (2005).
218. Mikolaiki, M. (Philipps-Universität Marburg, 2014).
219. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774-797 (2007).
220. Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. & Wall, R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179**, 125-142 (1984).
221. Milne, J.C. & Collier, R.J. Ph-Dependent Permeabilization of the Plasma-Membrane of Mammalian-Cells by Anthrax Protective Antigen. *Mol. Microbiol.* **10**, 647-653 (1993).
222. Milne, J.C., Furlong, D., Hanna, P.C., Wall, J.S. & Collier, R.J. Anthrax Protective Antigen Forms Oligomers during Intoxication of Mammalian-Cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 20607-20612 (1994).
223. Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H. & Liddington, R.C. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* **385**, 833-838 (1997).
224. Potts, J.R. & Campbell, I.D. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol.* **15**, 313-320 (1996).
225. Bork, P., Holm, L. & Sander, C. The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.* **242**, 309-320 (1994).
226. Campbell, I.D. & Spitzfaden, C. Building Proteins with Fibronectin Type-III Modules. *Structure* **2**, 333-337 (1994).
227. Jones, E.Y. The Immunoglobulin Superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 846-852 (1993).
228. Lipovsek, D. et al. Evolution of an interloop disulfide bond in high-affinity antibody mimics based on fibronectin type III domain and selected by yeast surface display: Molecular convergence with single-domain camelid and shark antibodies. *J. Mol. Biol.* **368**, 1024-1041 (2007).
229. Richards, J. et al. Engineered fibronectin type III domain with a RGDWXE sequence binds with enhanced affinity and specificity to human alpha v beta 3 integrin. *J. Mol. Biol.* **326**, 1475-1488 (2003).
230. Billings, K.S., Best, R.B., Rutherford, T.J. & Clarke, J. Crosstalk between the protein surface and hydrophobic core in a core-swapped fibronectin type III domain. *J. Mol. Biol.* **375**, 560-571 (2008).
231. Ng, S.P., Billings, K.S., Randles, L.G. & Clarke, J. Manipulating the stability of fibronectin type III domains by protein engineering. *Nanotechnology* **19** (2008).

232. Siggers, K., Soto, C. & Palmer, A.G. Conformational dynamics in loop swap mutants of homologous fibronectin type III domains. *Biophys. J.* **93**, 2447-2456 (2007).
233. Bloom, L. & Calabro, V. FN3: a new protein scaffold reaches the clinic. *Drug Discov Today* **14**, 949-955 (2009).
234. Bowditch, R.D., Loftus, J.C. & Tani, P.H. In vitro selection of fibronectin gain of function mutations. *Blood* **94**, 446a-446a (1999).
235. Dutta, S., Batori, V., Koide, A. & Koide, S. High-affinity fragment complementation of a fibronectin type III domain and its application to stability enhancement. *Protein Sci.* **14**, 2838-2848 (2005).
236. Tani, P.H., Loftus, J.C. & Bowditch, R.D. In vitro selection of fibronectin gain-of-function mutations. *Biochem. J.* **365**, 287-294 (2002).
237. Bateman, A. & Chothia, C. Fibronectin type III domains in yeast detected by a hidden Markov model. *Curr. Biol.* **6**, 1544-1547 (1996).
238. Paczkowski, J.E., Richardson, B.C., Strassner, A.M. & Fromme, J.C. The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO J.* **31**, 4191-4203 (2012).
239. Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T. & Ben-Tal, N. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **38**, W529-W533 (2010).
240. Celniker, G. et al. ConSurf: Using Evolutionary Data to Raise Testable Hypotheses about Protein Function. *Isr J Chem* **53**, 199-206 (2013).
241. Zeidan, M.B., Carmona, L., Zara, S. & Marcos, J.F. FLO11 Gene Is Involved in the Interaction of Flor Strains of *Saccharomyces cerevisiae* with a Biofilm-Promoting Synthetic Hexapeptide. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 6023-6032 (2013).
242. Woody, R.W. Aromatic Side-Chain Contributions to Far Ultraviolet Circular-Dichroism of Peptides and Proteins. *Biopolymers* **17**, 1451-1467 (1978).
243. Hanazono, Y. et al. Crystal structures of chitin binding domains of chitinase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *FEBS Lett.* **590**, 298-304 (2016).
244. Vuilleumier, S., Sancho, J., Loewenthal, R. & Fersht, A.R. Circular-Dichroism Studies of Barnase and Its Mutants - Characterization of the Contribution of Aromatic Side-Chains. *Biochemistry* **32**, 10303-10313 (1993).
245. Lawrence, M.S., Phillips, K.J. & Liu, D.R. Supercharging proteins can impart unusual resilience. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10110-+ (2007).

246. Lee, C.C., Perchiacca, J.M. & Tessier, P.M. Toward aggregation-resistant antibodies by design. *Trends Biotechnol.* **31**, 612-620 (2013).
247. Kisko, K. et al. Self-Assembled Films of Hydrophobin Proteins HFBI and HFBII Studied in Situ at the Air/Water Interface. *Langmuir* **25**, 1612-1619 (2009).
248. Wang, X.Q., Graveland-Bikker, J.F., De Kruif, C.G. & Robillard, G.T. Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: From soluble state to self-assembly. *Protein Sci.* **13**, 810-821 (2004).
249. Sunde, M., Kwan, A.H., Templeton, M.D., Beever, R.E. & Mackay, J.P. Structural analysis of hydrophobins. *Micron* **39**, 773-784 (2008).
250. Bayry, J., Aimanianda, V., Guijarro, J.I., Sunde, M. & Latge, J.P. Hydrophobins-unique fungal proteins. *PLoS Pathog.* **8**, e1002700 (2012).
251. Benson, S.D., Stroud, P.A., Morgan, S.E., Cannon, G.C. & McCormick, C.L. Characterization of assembled states of SC3 hydrophobin from *Schizophyllum commune*. *Abstr Pap Am Chem S* **226**, U509-U510 (2003).
252. Stroud, P.A., Goodwin, J.S., Butko, P., Cannon, G.C. & McCormick, C.L. Experimental evidence for multiple assembled states of Sc3 from *Schizophyllum commune*. *Biomacromolecules* **4**, 956-967 (2003).
253. Hakanpaa, J. et al. Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI - The structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction. *Protein Sci.* **15**, 2129-2140 (2006).
254. Roberts, R.L. & Fink, G.R. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* **8**, 2974-2985 (1994).
255. Gagiano, M., van Dyk, D., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G. & Pretorius, I.S. Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **31**, 103-116 (1999).
256. Santhiya, D. et al. Bioinspired Deposition of TiO<sub>2</sub> Thin Films Induced by Hydrophobins. *Langmuir* **26**, 6494-6502 (2010).
257. Liu, H., Styles, C.A. & Fink, G.R. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144**, 967-978 (1996).
258. Steentoft, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* **32**, 1478-1488 (2013).



- 
259. Meem, M.H. & Cullen, P.J. The impact of protein glycosylation on Flo11-dependent adherence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Res* **12**, 809-818 (2012).
260. Dengis, P.B., Nelissen, L.R. & Rouxhet, P.G. Mechanisms of Yeast Flocculation - Comparison of Top-Fermenting and Bottom-Fermenting Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 718-728 (1995).
261. Darling, R.J. et al. Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: Role of electrostatic interactions. *Biochemistry* **41**, 14524-14531 (2002).
262. Syed, R.S. et al. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* **395**, 511-516 (1998).
263. Piervincenzi, R.T. & Chilkoti, A. Effect of genetic circular permutation near the active site on the activity and stability of an enzyme inhibitor. *Biomolecular engineering* **21**, 33-42 (2004).
264. Wiegand, G., Epp, O. & Huber, R. The crystal structure of porcine pancreatic alpha-amylase in complex with the microbial inhibitor Tendamistat. *J. Mol. Biol.* **247**, 99-110 (1995).
265. Villa Braslavsky, C.I., Nowak, C., Gorlich, D., Wittinghofer, A. & Kuhlmann, J. Different structural and kinetic requirements for the interaction of Ran with the Ran-binding domains from RanBP2 and importin-beta. *Biochemistry* **39**, 11629-11639 (2000).
266. Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Gorlich, D. & Wittinghofer, A. Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* **97**, 635-646 (1999).
267. Arac, D. et al. Structures of neuroligin-1 and the neuroligin-1/neurexin-1 beta complex reveal specific protein-protein and protein-Ca<sup>2+</sup> interactions. *Neuron* **56**, 992-1003 (2007).
268. Muller, J.J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K. & Heinemann, U. Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 2786-2789 (2001).
269. Vandermerwe, P.A. et al. Human Cell-Adhesion Molecule Cd2 Binds Cd58 (Lfa-3) with a Very-Low Affinity and an Extremely Fast Dissociation Rate but Does Not Bind Cd48 or Cd59. *Biochemistry* **33**, 10149-10160 (1994).
270. Wang, J. et al. Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell* **97**, 791-803 (1999).
271. Pornillos, O. et al. Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *EMBO J.* **21**, 2397-2406 (2002).

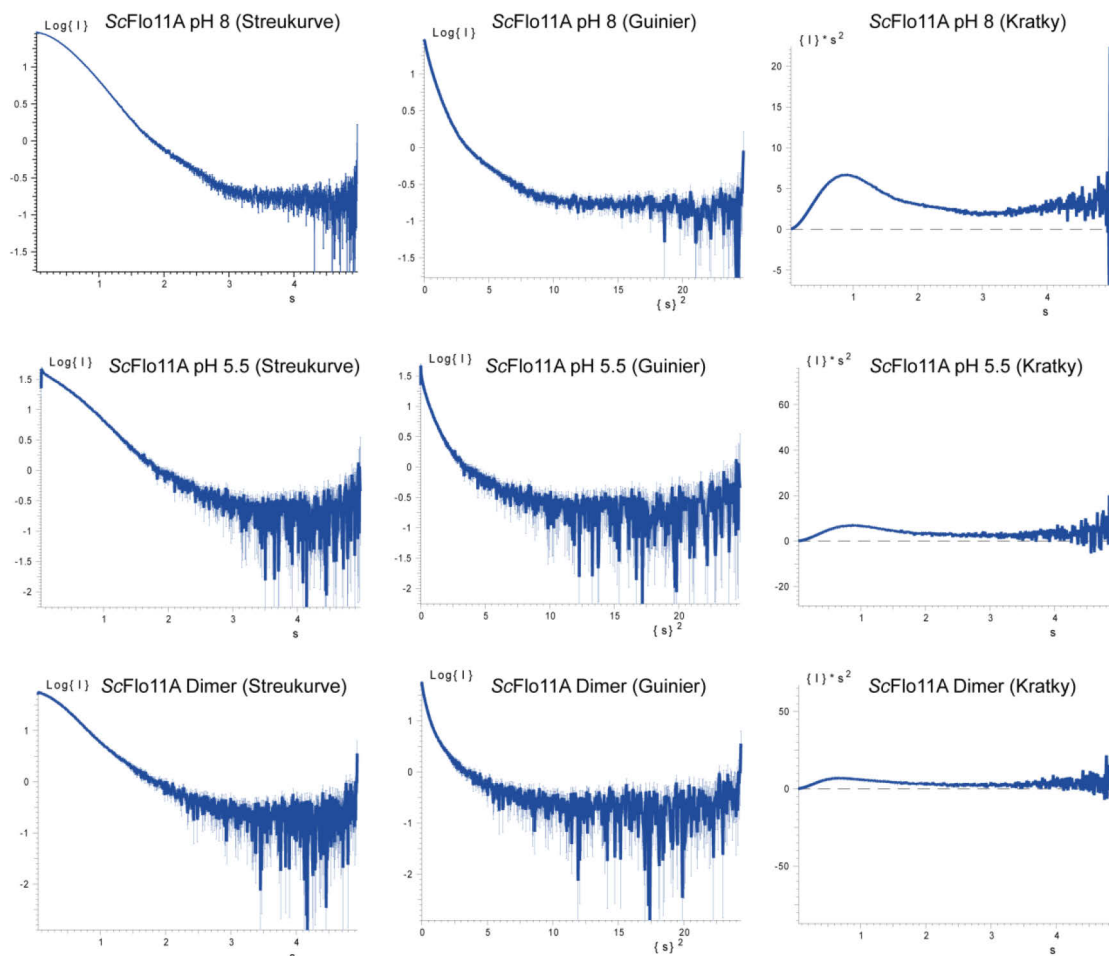
272. Sundquist, W.I. et al. Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol. Cell* **13**, 783-789 (2004).
273. Hallpike, C.R. Green Beard Theory. *Behav. Brain Sci.* **12**, 528-529 (1989).
274. Hamilton, W.D. The genetical evolution of social behaviour. I. *J. Theor. Biol.* **7**, 1-16 (1964).
275. Hamilton, W.D. The genetical evolution of social behaviour. II. *J. Theor. Biol.* **7**, 17-52 (1964).
276. Gardner, A. & Welch, J.J. A formal theory of the selfish gene. *J. Evol. Biol.* **24**, 1801-1813 (2011).
277. Yanai, I. & Lercher, M.J. Forty years of The Selfish Gene are not enough. *Genome Biol.* **17**, 39 (2016).
278. Queller, D.C. Kin Selection and Frequency-Dependence - a Game Theoretic Approach. *Biol J Linn Soc* **23**, 133-143 (1984).
279. Vachova, L. et al. Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *J. Cell Biol.* **194**, 679-687 (2011).
280. Beauvais, A., Loussert, C., Prevost, M.C., Verstrepen, K. & Latge, J.P. Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in FLO1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Fems Yeast Res* **9**, 411-419 (2009).
281. Atkins, A.R. et al. Association between the first two immunoglobulin-like domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *FEBS Lett.* **451**, 162-168 (1999).
282. Jensen, P.H. et al. Structure and interactions of NCAM modules 1 and 2, basic elements in neural cell adhesion. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 486-493 (1999).
283. Kiselyov, V.V. et al. The first immunoglobulin-like neural cell adhesion molecule (NCAM) domain is involved in double-reciprocal interaction with the second immunoglobulin-like NCAM domain and in heparin binding. *J. Biol. Chem.* **272**, 10125-10134 (1997).
284. Meyer, E.E., Rosenberg, K.J. & Israelachvili, J. Recent progress in understanding hydrophobic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15739-15746 (2006).
285. Israelachvili, J. & Pashley, R. The Hydrophobic Interaction Is Long-Range, Decaying Exponentially with Distance. *Nature* **300**, 341-342 (1982).
286. van Oss, C.J. Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *J. Mol. Recognit.* **16**, 177-190 (2003).

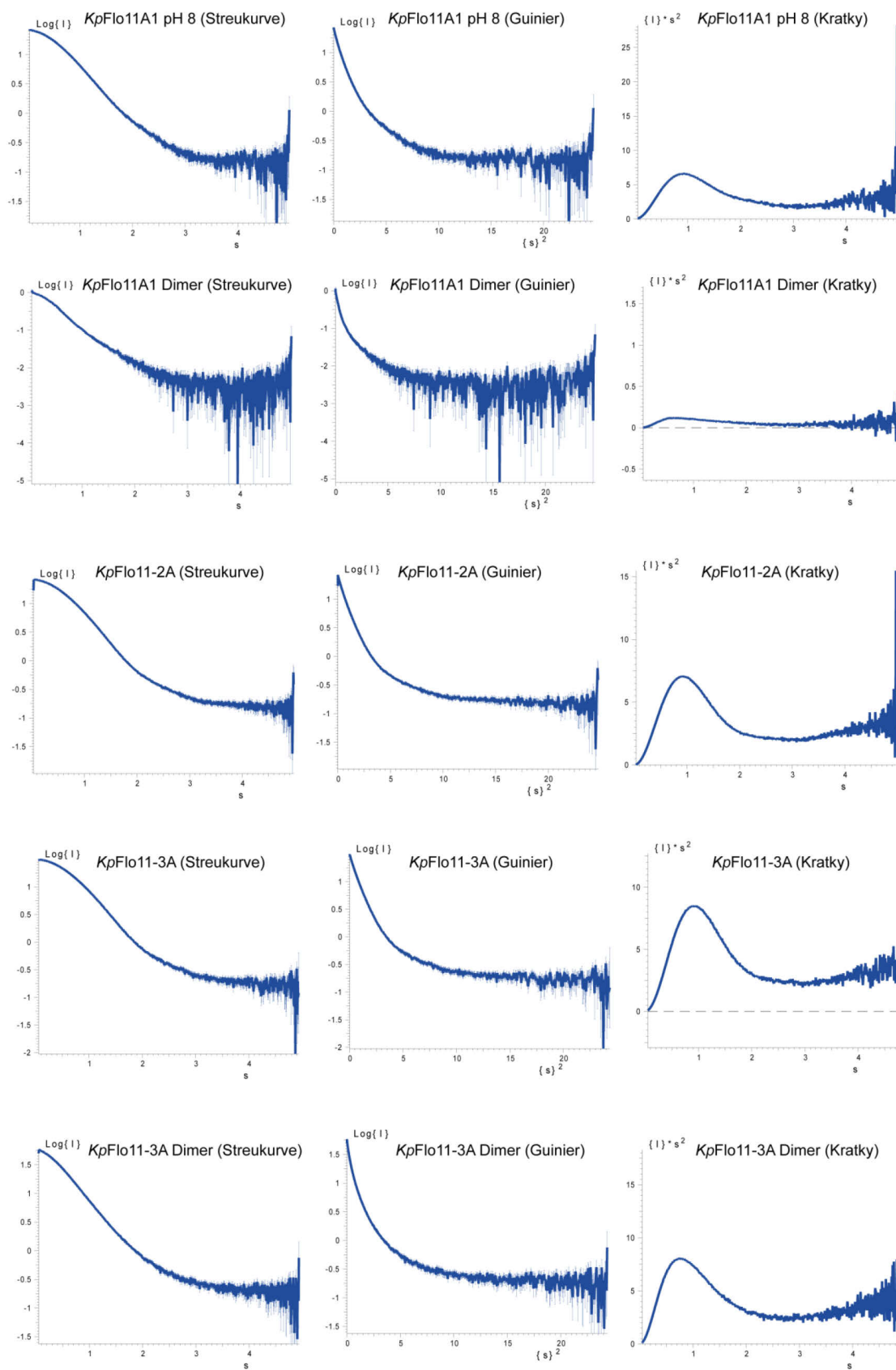
- 
287. Ball, P. Water as an active constituent in cell biology. *Chem. Rev.* **108**, 74-108 (2008).
288. Hampton, M.A. & Nguyen, A.V. Nanobubbles and the nanobubble bridging capillary force. *Adv. Colloid Interface Sci.* **154**, 30-55 (2010).
289. Schubert, H. Nanobubbles, hydrophobic effect, heterocoagulation and hydrodynamics in flotation (vol 78, pg 11, 2005). *Int J Miner Process* **78**, 269-269 (2006).
290. Schubert, H. Nanobubbles, hydrophobic effect, heterocoagulation and hydrodynamics in flotation. *Int J Miner Process* **78**, 11-21 (2005).
291. Fernandez-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. & Serrano, L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1302-1306 (2004).
292. Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F. & Serrano, L. A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J. Mol. Biol.* **342**, 345-353 (2004).
293. Rousseau, F., Schymkowitz, J. & Serrano, L. Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 118-126 (2006).
294. Barten, D.M. & Albright, C.F. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* **37**, 171-186 (2008).
295. Elgersma, R.C. et al. Transformation of the amyloidogenic peptide amylin(20-29) into its corresponding peptoid and retropeptoid: Access to both an amyloid inhibitor and template for self-assembled supramolecular tapes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 1837-1842 (2007).
296. Scholtmeijer, K., de Vocht, M.L., Rink, R., Robillard, G.T. & Wosten, H.A.B. Assembly of the Fungal SC3 Hydrophobin into Functional Amyloid Fibrils Depends on Its Concentration and Is Promoted by Cell Wall Polysaccharides. *J. Biol. Chem.* **284**, 26309-26314 (2009).
297. Rauceo, J.M. et al. Global cell surface conformational shift mediated by a *Candida albicans* adhesin. *Infect. Immun.* **72**, 4948-4955 (2004).
298. Shen, Z.M. et al. Delineation of functional regions within the subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion molecule a-agglutinin. *J. Biol. Chem.* **276**, 15768-15775 (2001).
299. Zara, G., Zara, S., Pinna, C., Marceddu, S. & Budroni, M. FLO11 gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol-Sgm* **155**, 3838-3846 (2009).

## 7 Anhang

### 7.1 SAXS Kurven

In den Kapiteln 2.2.10, 2.5.8, 2.5.9 und 2.6.4 wurden die verschiedenen Flo11A Domänen mittels SAXS auf ihr Verhalten in Lösung analysiert. Dort sind jeweils die *pair-distribution function* und die modellierten Molekühlüllen dargestellt. Hier sind noch die Streukurven, die Guinier plots und der Kratky Plot aller analysierten Flo11A Domänen aufgelistet. Die Streukurven ( $\text{Log}(I)$  gegen  $s$ ) stellen die Rohdaten aus den SAXS Messungen dar. Der Guinier Plot (Anfangsbereich) ( $\text{Log}(I)$  gegen  $s^2$ ) zeigt, dass für alle Messungen nicht-aggregiertes Protein erhalten wurde. Der Kratky Plot gibt Auskunft über die Konformation und Flexibilität und zeigt für alle Flo11A Domäne eine glockenartige Verteilung, was dem Muster globulärer Proteine entspricht.





## 7.2 Aminosäuresequenzen der analysierten Flo11A Domänen

### >ScFlo11A-His<sub>6</sub>

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMFPTALVPRGSSEGTSCNSIVNGCPNLDFNW  
HMDQQNIMQYTLDVTSVSWVQDNTYQITIHKVKENIDLKYLWSLKIIGVTGPK  
GTVQLYGYNENTYLIDNPTDFTATFEVYATQDVNSCQVWMPNFQIQFEYLQG  
SAAQYASSWQWGTTSTFDLSTGCNNYDNQGHSTDFPGFYWNIDCDNNCGG  
TKSS

### >ΣFlo11A-His<sub>6</sub>

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMFPTALVPRGSSEGTSCNSIVNGCPNLDFNW  
HMNQQNIMQYTLDVTSVSWVQDNTYQITIHKVEENIDLKYLSSLKIIGVTGPK  
DTVQLYGYDENTDWIDNPLVSRCDENTYLIDNPTDFTATFEVYATQDVNSCQV  
WMPNFQIQFEYLQGSAAEYACSWEWGTTSTFYLTGCDNYDNQGYSTDFP  
GFYWNIDCDNNCAPVPTPS

### >KpFlo11A1-His<sub>6</sub>

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSSGKTCPTSEVSPACYANQWETTFPPSDIKI  
TGATWVQDNIYDVTLSEAESELENLTELKIIGLNSPTGGTKLVWSLNSKVYDI  
DNPAKWTTTTLRVYTKSSADDCYVEMYPFQIQVDWCEAGASTDGCSAWKWP  
KSYDYGCDNMQDGVSRKHHPVYKWPCKCSSDCGVEPTT

### >KpFlo11-2A

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMEQSDVEPACYARQWENTFPPSNIYVSSAT  
WVRDNVYDVTLRYEAESEHLRSLGELKVIGLNSPVSGTKVVYSRNSKIYEINDP  
SSWSTTIRVNAKDSADGCHVEMYPFQIQVEWCQAGADTDECSSWPYPVSVYD  
YDIGCDNMQDGVSRKHHAHYRWLKHVSVCSSAASTV

### >KpFlo11-3A

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMEQSDVEPACYARQWENTFPPSNIYVTSAT  
WVRDNVYDVTLHYEADSLHLRSLGELKVIGLNSPTSGTKVVYSRNSKIYDINDP  
SSWSTTIRVNARDSADGCHVEMYPFQIQVEWCQAGADTDECNAWPYPNVYD  
YDIGCDNMQDGISRKHHAHYRWLKHVSVCSTPSTV

### 7.3 Abkürzungen

Å	Ångstrom (1 Å = 100 pm = 10 <sup>-10</sup> m)
Asp	Aspartat
<i>C-terminal</i>	Carboxyterminal
CV	<i>Column Volume</i> (Säulenvolumen)
Da / kDa	Dalton (1 Da = 1 u = 1,660538921*10 <sup>-27</sup> kg)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Glu	Glutamat
M	Molar (mol/L)
<i>N-terminal</i>	Aminoterminal
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
r.m.s.d.	Root mean square deviation (quadratische Mittelwertabweichung)
r.p.m.	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SPR	Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonresonanz)
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich herzlich für die Aufnahme in seine AG, die interessante Themenstellung, die hervorragende, wissenschaftliche Betreuung, sowie für den Freiraum bei der Planung, Gestaltung und Durchführung aller Experimente.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie die gesamte Kooperation auf biologischer Ebene.

Herrn Dr. Michael Kock danke ich für die Hilfe bei allen Fragen der Kristallographie.

Dr. Maik Veelders danke ich für die vorangegangenen Experimente auf dem Flo11 Gebiet, sowie für manche hilfreiche E-Mail.

Herrn Dr. Stefan Brückner danke ich für die gelungene Zusammenarbeit und fruchtbaren Diskussionen über die spannende Welt der Pilze.

Herrn Dr. Daniel Rhinow danke ich für die Zusammenarbeit bei den FIB-SEM Messungen.

Vivekanand Patil (und Dr. Sarah Schladebeck) danke ich für die Hilfe bei den Messungen durch qRT-PCR.

Dr. Frank Noll danke ich für die Hilfe bei den Kontaktwinkelmessungen in der AG Hampp.

Dr. Katrin Anders, Vitali Kalugin und Elisabeth Ignatz danke ich sehr herzlich für die Korrektur dieser Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe Essen gilt ein sehr großer Dank für die stets freundliche Atmosphäre und die gesamte Zeit während meiner Promotion. Zur Zeit der Abgabe der Arbeit umfasste die Gruppe folgende Personen: Katrin Anders, Ankan Banerjee, Sophie Franz, Petra Gnau, Verena Gruth, Sebastian Hepp, Silke von Horsten, Elisabeth Ignatz, Vitali Kalugin, Thomas Marcellino, Ralf Pöschke, Simon Straß, Marian Vogt.



Bei meinen Vertiefer-, Bachelor- und Masterstudenten Franka Schreiner, Andreas Bäcker, Maximilian Mikolaiski, Levke Andersen und Steffen Skowaisa bedanke ich mich für die Zusammenarbeit und wünsche ihnen auf diesem Wege alles Gute für ihr wissenschaftliches Profil.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für die gesamte Unterstützung während des Studiums, der Promotion und darüber hinaus! Ein kleiner Dank auch an den Kater Moritz für das Bereitstellen des Katzenschnurrhaars, welches als einziges Kristalle erzeugt hat.